

„TRANSITION-STATE ANALOGA“

der von Lactatdehydrogenase katalysierten Reaktion

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

Hannelore Kapmeyer

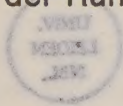
Bochum 1976

„TRANSITION-STATE ANALOGA“

der von Lactatdehydrogenase katalysierten Reaktion

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum



vorgelegt von

Hannelore Kapmeyer

Bochum 1976

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl Biochemie
der Abteilung Chemie der Ruhr-Universität Bochum
in der Zeit von Jan. 1974 bis Jan. 1976 unter der
Anleitung von

Herrn Professor Dr. Gerhard Pfeleiderer
angefertigt.



Herrn Professor Dr. G. Pfeleiderer spreche ich
meinen Dank aus für die Überlassung des Themas
und für sein reges Interesse an meiner Arbeit.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. W. Trommer für
viele wertvolle Ratschläge und Anregungen bei
der Ausführung der Arbeit.

Den Mitarbeitern des Instituts schulde ich Dank
für viele kleine und große Hilfen.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546609_0037

I N H A L T S A N G A B E

	Seite
1.0.0. Einleitung und Aufgabenstellung	1
E R G E B N I S S E u n d D I S K U S S I O N	
2.0.0. Synthese von Coenzym-Substrat-Analoga und ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften	8
2.1.0. Synthese von 5' substituierten Nicotinamid-Derivaten	9
2.1.1. Synthese von 4-(5-Carbamido-3-pyridyl)-2-oxo-butensäure	10
2.1.2. Synthese von 5- α -Ketobutyrat- und 5- α -Hydroxybutyrat-Nicotinamid	11
2.1.3. Dünnschichtchromatographie und elektro-phoretische Reinheitsprüfung	14
2.2.0. Synthese der NAD- und NADH-Derivate	15
2.2.1. Synthese von 5- α -Ketobutyrat-NAD	15
2.2.2. Synthese von 5- α -Hydroxybutyrat-NAD	18
2.2.3. Chemische Reduktion von NAD-Derivaten	20
2.2.4. Chromatographische und elektrophoretische Eigenschaften der NAD- und NADH-Derivate	22
2.2.5. Additionsverbindungen der NAD-Derivate	23
2.2.6. Redoxpotentiale der NAD-Derivate	25
2.2.7. UV- und Fluoreszenz-Spektren der NADH-Derivate	27
3.0.0. Biochemische Eigenschaften der Nicotinamid-, NAD- und NADH-Derivate	29
3.1.0. Biochemische Eigenschaften der Nicotinamid-Derivate	32
3.2.0. Biochemische Eigenschaften von 5- α -Keto-butyrat-NAD	36
3.2.1. Untersuchungen zur Coenzymaktivität von 5- α -Ketobutyrat-NAD	37
3.2.2. Art und Ausmaß der Hemmung verschiedener Dehydrogenasen mit 5- α -Ketobutyrat-NAD	38
3.2.3. Untersuchungen zur Substrataktivität von 5- α -Ketobutyrat-NAD	45

3.3.0. Biochemische Eigenschaften von 5- α -Keto-butyrat-NADH	48
3.3.1. Hydridübertragung katalysiert durch die LDH	48
3.3.2. Kinetische Untersuchungen der Hydridübertragung katalysiert durch die LDH	50
3.3.3. Substratanaloge Reaktion von 5- α -Keto-butyrat-NADH katalysiert von der D-LDH	58
3.3.4. Hydridübertragung katalysiert durch die L-Alanin-DH	60
3.3.5. Biochemische Eigenschaften von 5- α -Keto-butyrat-NADH gegenüber Dehydrogenasen, die pyruvat-ähnliche Substrate reduzieren	65
3.3.6. Biochemische Eigenschaften von 5- α -Keto-butyrat-NADH gegenüber Dehydrogenasen, die Substrate ohne Carboxyl-Gruppe reduzieren	68
3.3.7. Hemmung verschiedener Dehydrogenasen durch 5- α -Ketobutytrat-NAD und 5- α -Ketobutytrat-NADH	69
3.3.8. Diskussion des biochemischen Verhaltens von 5- α -Ketobutytrat-NADH	74
3.4.0. Biochemische Eigenschaften von 5- α -Hydroxy-butytrat-NAD	76
3.5.0. Biochemische Eigenschaften von 5-Carboxy-NADH	77
3.5.1. Bindung von 5-Carboxy-NADH an verschiedene Dehydrogenasen	78
3.5.2. Hemmung verschiedener Dehydrogenasen durch 5-Carboxy-NADH	80
4.0.0. Zusammenfassung der Ergebnisse	82

M A T E R I A L u n d M E T H O D E N

5.0.0. Synthesen	86
5.1.0. 4-(5-Carboxamido-3-pyridyl)-2-on-but-3-ensäure	86
5.2.0. 4-(5-Carboxamido-3-Pyridyl)-2-on-buttersäure (5- α -Ketobutytrat-Nicotinamid)	86

5.3.0.	4-(5-Carboxamido-3-pyridyl)-2-hydroxy-butter-säure (5- α -Hydroxybutyrat-Nicotinamid)	87
5.4.0.	5-(2-Oxalyl-äthyl)-nicotinamid-adenin-dinucleotid (5- α -Ketobutyrat-NAD)	88
5.5.0.	5-(2-Oxalyl-äthyl)-nicotinamid-adenin-dinucleotid, red. Form (5- α -Ketobutyrat-NADH)	88
5.6.0.	5-(3-Carboxy-3-hydroxypropyl)-nicotinamid-adenin-dinucleotid (5- α -Hydroxybutyrat-NAD)	89
5.7.0.	5-(3-Carboxy-3-hydroxypropyl)-nicotinamid-adenin-dinucleotid, red. Form (5- α -Hydroxybutyrat-NADH)	90
5.8.0.	5-Carboxy-nicotinamid-adenin-dinucleotid, red. Form (5-Carboxy-NADH)	90
5.9.0.	Additionsverbindungen von NAD und NAD-Derivaten	91
6.0.0.	Analytische Messungen	92
6.1.0.	UV-Spektren	92
6.2.0.	^1H -Kernresonanzspektren	92
6.3.0.	IR-Spektren	92
6.4.0.	Elementaranalysen	92
6.5.0.	Schmelzpunktsbestimmung	93
6.6.0.	Hochspannungselektrophorese	93
6.7.0.	Dünnschichtchromatographie	93
6.8.0.	Säulenchromatographie	94
6.9.0.	Test auf quartäre Pyridinium-Verbindungen	94
6.10.0.	Nachweis auf Aminosäuren mit Ninhydrin	94
6.11.0.	Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten der CN-Addition nach Wallenfels	95
7.0.0.	Enzymatische Messungen	96
7.1.0.	Bestimmung der Proteinkonzentration	96
7.2.0.	Messung der spezifischen Aktivität verschiedener Dehydrogenasen	96
7.2.1.	Spezifische Aktivität der Alanin-DH	97
7.2.2.	Spezifische Aktivität der ADH	97
7.2.3.	Spezifische Aktivität der GAPDH	97
7.2.4.	Spezifische Aktivität der Glycerat-DH	98
7.2.5.	Spezifische Aktivität der Glycerol-DH	98

7.2.6. Spezifische Aktivität der LDH und D-LDH	98
7.2.7. Spezifische Aktivität der MDH	99
7.3.0. Spezifische Aktivität der NAD-Glycohydrolase	99
7.4.0. Hemmung der enzymatischen Oxydation bzw. Reduktion durch die NAD- und NADH-Derivate	100
7.4.1. Hemmung der enzymatischen Oxydation	101
7.4.2. Hemmung der enzymatischen Reduktion	102
7.5.0. Enzymatische Bestimmung von Lactat mit LDH und NAD	103
7.6.0. Bestimmung der K_M -, K_I - und V_{max} -Werte	103
7.7.0. Fluoreszenztitration zur Untersuchung von binären Enzym:Coenzym-Komplexen	104
7.8.0. Untersuchungen zur Bildung von ternären Komplexen	105
7.8.1. Ternärer LDH:Coenzym(red.):Oxamat- Komplex	105
7.8.2. Ternärer ADH:Coenzym(red.):Acetamid- Komplex	105
7.8.3. Ternärer LDH:Coenzym(oxy.):Sulfit- Komplex	106
7.9.0. Enzymatische Hydrolyse von NAD-Derivaten mit der NAD-Glycohydrolase	106
8.0.0. Bezugsquellen der Enzyme	108
9.0.0. Literaturverzeichnis	109

Verwendete Abkürzungen:

ADH	Alkoholdehydrogenase
ADPR	Adenosin-diphosphat-ribose
Ala	Alanin
ATP	Adenosin-triphosphat
DH	Dehydrogenase
E	Enzym
E_0	Redoxpotential
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Ile	Isoleucin
K_A	Gleichgewichtskonstante
K_D	Dissoziationskonstante
K_M	Michaeliskonstante
K_I	Inhibitorkonstante
LDH H_4 ;	Lactatdehydrogenase aus Herzmuskel
LDH M_4	Lactatdehydrogenase aus Muskel
D-LDH	D-Lactatdehydrogenase
MDH	Malatdehydrogenase
NAD/NADH	oxydiertes bzw. reduziertes Nicotinamid- adenin-dinucleotid
Val	Valin
V_{max}	maximale Umsatzgeschwindigkeit

1.0.0. Einleitung und Aufgabenstellung

Wohl kaum ein Zweig der Naturwissenschaften hat in den letzten Jahrzehnten eine derartig stürmische Entwicklung erlebt, wie die Biochemie. Zahllose Stoffwechselvorgänge wurden entdeckt, Reaktionsfolgen aufgeklärt und die sie katalysierenden Enzyme untersucht. Trotz aller Kenntnis über die Struktur der Enzyme und der Thermodynamik sowie der Kinetik der enzymatischen Reaktionen, ist man von einem wirklichen Verständnis der Enzymwirkung noch weit entfernt.

In der organischen Chemie erklärt man heute die Reaktionen auf der Grundlage der Elektronentheorie der chemischen Bindung. Im Prinzip sollte das bei der enzymatischen Umsetzung auch möglich sein, doch ist hierbei ein Reaktionspartner stets ein Enzym, d.h. ein hochmolekulares Protein, dessen Aminosäure-Sequenz und Konformation noch in vielen Fällen unbekannt sind.

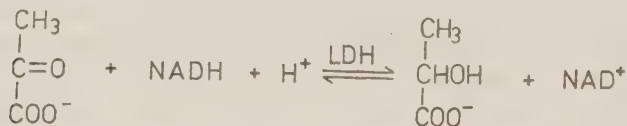
Räumliche Annäherung der Reaktionspartner und Orientierungseffekte werden als wesentliche Faktoren für die katalytische Effektivität von Enzymen angesehen. Das Enzym ordnet Coenzym und Substrat in solcher Weise, daß neben einer höheren Stoßwahrscheinlichkeit auch die Zahl solcher Kollisionen erhöht wird, die zur Reaktion führen.

Neben der Bindung und Orientierung hat das Enzym die Funktion der Aktivierung. Bei den meisten bislang untersuchten Mechanismen der Enzymkatalyse beruht die Aktivierung auf Wasserstoffbrücken-Bindung zwischen Enzym und reagierender Gruppe des Substrats. Diese können sich aber nur bilden, wenn das Enzym die dafür notwendige Bindung und Orientierung der Reaktionspartner bewirkt.

Eine große Zahl von Redox-Reaktionen wird von Dehydrogenasen katalysiert, die Wasserstoff vom Coenzym Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduzierte Form (NADH) auf ihr Substrat übertragen und umgekehrt. Die Arbeitsgruppen von Westheimer (1) und

Vennesland (2) konnten mit deuterierten Substraten zeigen, daß ein Hydridion auf das C-4-Atom im Nicotinamid-Teil des Coenzyms übertragen wird. Je nach der Spezifität der Dehydrogenasen tritt das Hydrid-Ion oberhalb oder unterhalb der Pyridin-Ringebene ein (3), so daß man von einer A- und B-Seite des Nicotinamid-Ringes spricht. Verschiedene Konformationen des NAD's sind durch NMR-Messungen (4, 5) und Röntgenanalysen gefunden worden. Während das NAD bzw. NADH in Lösung in einer gefalteten Konformation vorliegt, zeigen die Untersuchungen in Gegenwart der meisten Dehydrogenasen, daß das Coenzym in einer gestreckten Konformation an das Enzym gebunden wird und daß beide aromatischen Ringe des Coenzyms in der anti Konformation vorliegen. Besonders auffallend ist, daß die Konformation des gebundenen Coenzyms bei einer Reihe von untersuchten Dehydrogenasen (LDH, MDH, ADH) gleich ist (7). Diese Ergebnisse weisen auf eine große Ähnlichkeit der Coenzym-Bindungsstelle bei diesen Dehydrogenasen hin.

Die Wechselwirkungen zwischen Coenzym und Enzym sind für mehrere Dehydrogenasen untersucht worden. Eine der am besten untersuchten Dehydrogenasen ist die Lactat-Dehydrogenase (LDH). Die LDH katalysiert die Reaktion:



Die Struktur der LDH läßt sich in drei Einheiten unterteilen (8, 9):

- 1.) Aminoterminaler Arm, der an der Bindung der 4 Untereinheiten beteiligt ist;
- 2.) Coenzym-Binding-Domain;
- 3.) Katalytisches Zentrum.

In Abbildung 1 ist die Coenzym-Bindungsstelle und das katalytische Zentrum mit dem gebundenen Coenzym NAD und dem Substrat Lactat zu sehen.

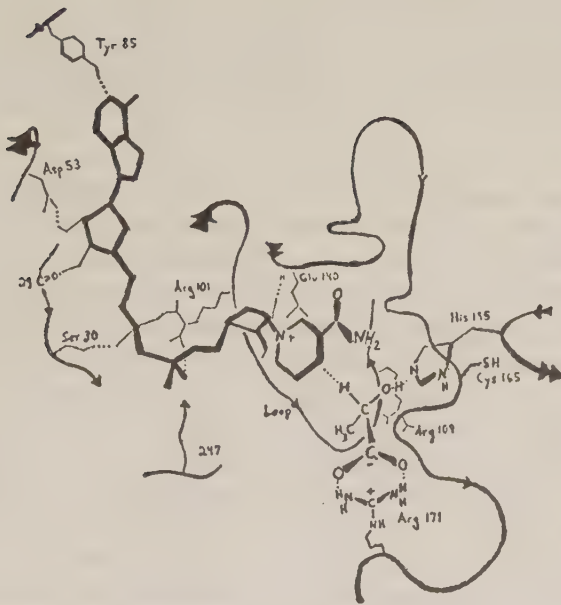


Abb. 1: Ternärer Komplex aus LDH:NAD:Lactat

Von der LDH sind nur die Teile der Proteinkette eingezeichnet, die sich in der Nähe des aktiven Zentrums befinden und deren Aminosäuren über ihre Restenebenvalente Bindungen mit Coenzym oder Substrat eingehen. Das Bild ist so dargestellt, daß der Betrachter sich im Inneren des Enzyms befindet.

Die Coenzym-Binding-Domain besteht erstens aus einer hydrophoben Tasche, gebildet aus Aminosäuren mit hydrophoben Resten (Val, Ile, Ala). In ihr wird der Adeninteil des Coenzym gebunden. Die beiden Hydroxyl-Gruppen der Ribose, benachbart dem Adenin, bilden Wasserstoff-Brücken mit der Carboxylgruppe des Asparaginsäure-Restes 53 und der Peptidbindung der Aminosäure 29. Besonders wichtig ist die ionische Wechselwirkung

der Pyrophosphat-Gruppe mit der Guanidino-Gruppe des Arginins 101, einer Aminosäure des Loops, der beim Übergang Apoenzym $\rightarrow$ ternärer Komplex einer starken Konformationsänderung unterliegt. Ausgelöst wird sie durch die coulombschen Kräfte zwischen Guanidino-Gruppe und der Pyrophosphat-Gruppe des Coenzyms.

Der Nicotinamid-Teil ragt bereits in das katalytische Zentrum hinein. Das C-4-Atom des Nicotinamids steht dem Imidazolring des essentiellen Histidins 195 gegenüber. Dazwischen lagert sich das Substrat der LDH an. Die Orientierung des Substrats wird durch die starken coulombschen Kräfte zwischen der Carboxylgruppe des Substrats und der Guanidinogruppe des Arginins 171 festgelegt. Röntgenstrukturanalytische Untersuchungen haben gezeigt, daß sich aufgrund dieser Orientierung eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Hydroxylgruppe des Lactats und dem basischen Stickstoff des Imidazols, bzw. der Carboxylgruppe des Pyruvats und dem protonierten Stickstoff des Imidazolringes ausbilden kann. Gleichzeitig befindet sich das α -C-Atom des Substrats in der Nähe des C-4-Atoms vom Nicotinamidring, so daß die räumliche Annäherung der Reaktionspartner gegeben ist.

Das aus röntgenstrukturanalytischen Daten erhaltene Bild des ternären LDH:Coenzym:Substrat-Komplexes wurde durch zahlreiche Modifizierungen der an der Coenzym- und Substrat-Bindung beteiligten Aminosäure-Reste bestätigt. Hierzu wurden vor allem spezifische Modifizierungs-Reagenzien angewandt, die aufgrund ihrer substrat- oder coenzymanalogen Struktur an die Substrat- bzw. Coenzym-Bindungsstelle gebunden werden und aus dieser Orientierung heraus mit dem in der Nähe befindlichen Aminosäure-Rest reagieren. Woenckhaus und Pfeleiderer (10) gelang auf diese Weise mit 3-Brom-acetylpyridin erstmals die Modifizierung des essentiellen Histidins 195, sowie die Isolierung und Sequenz-Analyse des Histidin-Peptids. Berghäuser benutzte Brompyruvat zur Modifizierung des gleichen Histidins (11).

Kinetische Messungen zur Untersuchung des Mechanismus der Katalyse der LDH (12, 13) haben gezeigt, daß man zwischen sieben verschiedenen Zuständen der LDH unterscheiden muß, wobei die Geschwindigkeit der einzelnen Teilschritte unterschiedlich schnell ist. Die Konformation der LDH in den verschiedenen binären Enzym:Coenzym- und ternären Enzym:Coenzym:Substrat-Komplexen ist teilweise verändert. Mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse lassen sich nur die Konformationen solcher Komplexe berechnen, die einerseits stabil sind und andererseits beim Auskristallisieren große und regelmäßige Kristalle ergeben. Hinzu kommt noch, daß durch die Röntgenstrukturanalyse nur das stationäre Bild des Kristalles wiedergegeben wird.

Diese Schwierigkeiten zeigen, daß trotz der hervorragenden Ergebnisse, die mit der Röntgenstrukturanalyse zu erzielen sind, man keine endgültige Aussage über die räumliche Anordnung bei der enzymatischen Katalyse erhalten kann.

Die Idee, die dieser Arbeit zugrunde lag, ist die Synthese eines Coenzym-Substrat-Modells für die LDH. Das Substrat sollte kovalent am Coenzym fixiert sein, damit eine intramolekulare Hydridübertragung möglich ist. Zeigen die Ergebnisse der enzymatischen Untersuchungen mit dem Coenzym-Substrat-Modell eine von der LDH katalysierte Hydridübertragung, so ist dies ein Beweis, daß es sich um ein Analogon des reaktiven Komplexes handelt.

Als Substrat sollte Pyruvat an das Coenzym NADH in dem Modell kovalent gebunden sein. Die Wahl des Verknüpfungspunkts des Substrats mit dem Coenzym fiel auf die 5-Stellung des Dihydropyridinringes. Mehrere Faktoren waren dafür maßgebend. Da die Hydridübertragung vom C-4-Atom aus erfolgt, schied diese Stelle aus. Nicotinamid-C-6-substituierte NAD-Derivate werden von mehreren untersuchten Dehydrogenasen nicht oder nur sehr schlecht gebunden, da diese Substituenten die syn-Konformation zwischen Nicotinamid und Ribose begünstigten (14). Aus den Daten der Röntgenstrukturanalyse weiß man aber, daß bei der

Bindung an das Enzym die anti-Konformation vorliegt (8). C-2 schien ebenfalls nicht geeignet, da die Carboxamid-Gruppe die Wechselwirkung zwischen der Carbonylfunktion des Pyruvats und der 4-Stellung des Ringes behindern dürfte.

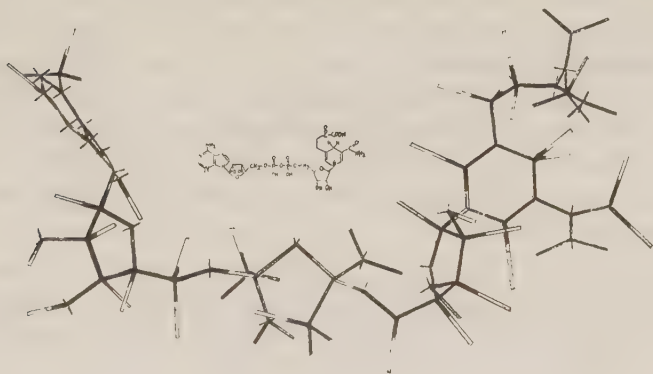


Abb. 2: Konfiguration und Konformation des 5- α -Ketobutyrat-NADH's

Somit erschien die C-5-Stellung am geeignetsten für die Verknüpfung beider Teile. Aus dem Bau von Molekülmodellen ergab sich, daß wegen der Verknüpfung in der 5-Stellung eine zusätzliche CH_2 -Gruppe notwendig ist, um die richtige Orientierung der Carbonyl- und Carboxyl-Gruppe im aktiven Zentrum zu erreichen.

Das aufgrund dieser Überlegungen geplante Coenzym-Substrat-Modell, das 5-(2-Oxalyl-äthyl)-nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduzierte Form (5- α -Ketobutyrat-NADH) ist in Abbildung 2 dargestellt.

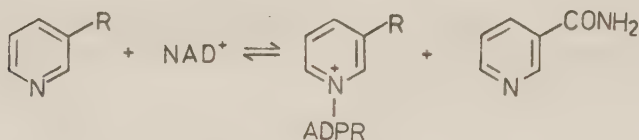
Unter Berücksichtigung der freien Drehbarkeit der Winkel ist das Modell in einer Konformation dargestellt, die zeigt, daß das Hydridion auf der A-Seite des Dihydropyridinringes in unmittelbarer Nähe des α -C-Atoms des Substrat-Teil liegt.

Somit ist in dem Coenzym-Substrat-Modell die Nähe zwischen Hydrid-Donator und Hydrid-Akzeptor vorhanden. Die Aufgabe der LDH besteht darin, durch Wechselwirkung mit der Carboxyl-Gruppe des Substrat-Teils die in Abb. 2 gezeigte Konformation herzustellen und gleichzeitig durch Wasserstoff-Brückenbindung mit der Carbonyl-Gruppe diese so zu polarisieren, daß die nötige Aktivierung für eine Hydridübertragung gegeben ist.

Durch Untersuchungen mit anderen NAD-abhängigen Dehydrogenasen soll die Spezifität des Coenzym-Substrat-Modells untersucht werden.

2.0.0. Synthese von Coenzym-Substrat-Analoga und ihre physikalischen und chemischen Eigenschaften

Ein häufig benutztes Verfahren für die Synthese von NAD-Analoga mit modifiziertem Pyridinteil ist die durch das Enzym NAD-Glycohydrolase katalysierte Transglycosidierung zwischen NAD und dem jeweiligen Pyridinderivat (15).



Nach diesem Verfahren sind in erster Linie NAD-Derivate hergestellt worden, bei denen die Säureamid-Gruppe am C-3 des Nicotinamidteils durch eine andere funktionelle Gruppe ersetzt worden ist. So konnten z.B. Pyridin-3-aldehyd (16), 3-Pyridylazid (17), 3-Acetylpyridin (18), Nicotinsäure (19) und andere 3' substituierte Pyridinderivate (20) erfolgreich zur Transglycosidierung eingesetzt werden.

Mit disubstituierten Pyridinen ist dagegen wesentlich seltener gearbeitet worden. Bislang sind nur Amino-(6' und 5') und Methyl-(2', 4', 5' und 6')-NAD-Derivate mit der NAD-Glycohydrolase synthetisiert worden (21, 14). Kaplan und Mitarbeiter (21) hatten auf die gleiche Art versucht NAD-Derivate herzustellen, die neben der Amidgruppe am C-3 noch einen stark Elektronen ziehenden Substituenten am C-5 des Nicotinamidteils tragen (5-Cyano-, 5-Fluoro- und 5-Amido-NAD). Da ihnen die Synthese nicht gelang, glaubten sie, daß die NAD-Glycohydrolase nur solche Pyridinderivate überträgt, die neben der Amidgruppe keinen weiteren Rest mit Elektronen abziehendem Effekt (-I oder -M) besitzen. Daß dies nicht zutrifft, konnte ich durch die Transglycosidierung von 5 Carboxy-Nicotinamid zeigen, einem Nicotinamiderivat mit einer zusätzlichen Elektronen abziehenden Carboxylgruppe.

Die soeben geschilderte geringe Spezifität der NAD-Glycodydrolase erlaubte damit die Vermutung, daß auch 5- α -Ketobutyrat- und 5- α -Hydroxybutyrat-Nicotinamid sich mit diesem Enzym in die entsprechenden NAD-Derivate überführen lassen.

2.1.0. Synthese von 5' substituiereten Nicotinamid-Derivaten

Die Synthese von 4-(5-Carbamido-3-pyridyl)-2-on-buttersäure (=5- α -Ketobutyrat-Nicotinamid) ist an diesem Lehrstuhl erstmals von H.Blume (23) durchgeführt worden. Nach dem gleichen Synthesepplan Abb. 3 wurde auch von mir 5- α -Ketobutyrat-Nicotinamid hergestellt.

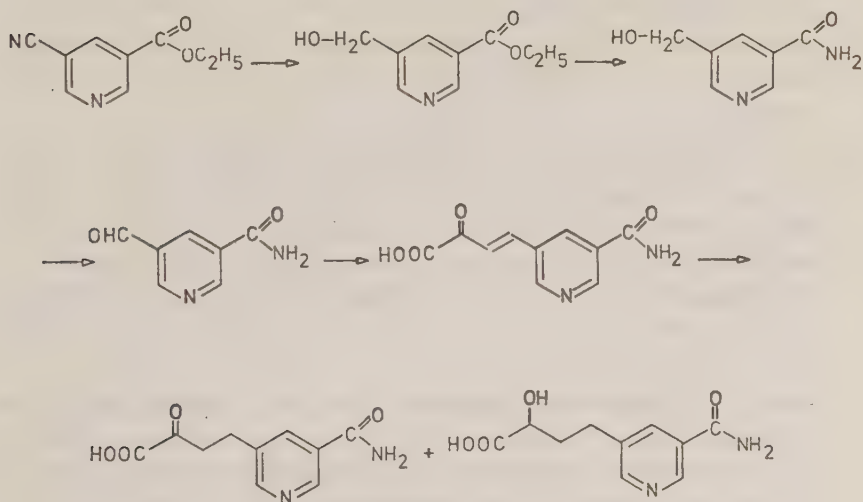


Abb. 3: Synthesepplan

Die Synthese mußte in einigen Punkten wegen höhere Reinheitsansprüche (vor allem für die enzymatischen Untersuchungen; siehe Abschn. 3.1.0.) und wegen der benötigten größeren Menge an 5- α -Ketobutyrat-Nicotinamid geändert werden.

2.1.1. Synthese von 4-(5-Carbamido-3-pyridyl)-2-oxo-butensäure

5-Cyano-Nicotinsäureäthylester, den schon Wallenfels dargestellt hat (24), entsteht glatt aus dem entsprechenden 5-Brom-Nicotinsäureester mit Kupfercyanid. Über Palladium/Aktivkohle läßt sich die Cyanogruppe im salzsauren Medium leicht zur Hydroxymethyl-Gruppe reduzieren. Die Überführung der Esterfunktion in die Amid-Funktion erfolgte mit flüssigem Ammoniak im Stahlautoklaven bei 110°C. Nach der Oxydation der Hydroxymethyl-Gruppe mit Mangandioxyd zum Aldehyd, wurde 5-Formyl-Nicotinamid durch eine Aldolkondensation mit Brenztraubensäure in die 4-(5-Carbamido-3-pyridyl)-2-oxo-but-3-en-säure überführt.

Für die Reduktion der Doppelbindung konnte das ungereinigte Kaliumsalz der Butensäure eingesetzt werden. Enzymatische Untersuchungen machten aber eine weitere Reinigung notwendig. Die Reinigung erfolgte säulenchromatographisch auf einem Sephadex-Anionenaustauscher. Wegen der starken Acidität der Carboxylgruppe eluierte die ungesättigte Säure erst mit einer 0,5 N Ameisensäure.

Die freie Säure wurde spektroskopisch und elementaranalytisch untersucht. Das IR-Spektrum in Abbildung 4 zeigt die typische Ammoniumstruktur (Banden bei 1900 und 2500 cm^{-1}), welche sich durch den Aufenthalt des Säureprotons am Pyridinstickstoff erklärt. Im Übrigen gleicht das IR-Spektrum dem des K-Salzes der 4-(5-Carbamido-3-pyridyl)-2-oxo-but-3-en-säure. Die Elementaranalyse (Abschnitt 5.1.0) zeigt, daß die freie Säure mit einem Mol Wasser auskristallisiert, was die bauchige Struktur der IR-Banden erklärt.

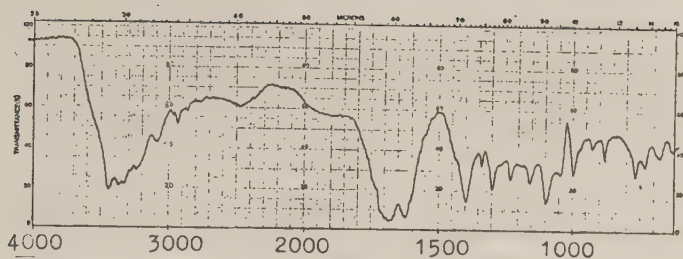


Abb. 4: IR-Spektrum

2.1.2 Synthese von 5- α -Ketobutyrat- und 5- α -Hydroxybutyrat-Nicotinamid

Während H. Blume (23) bei der Reduktion der Doppelbindung des α -Ketobutensäure-Restes mit Palladium auf Bariumsulfat in 50%iger Essigsäure nur das 5- α -Ketobutyrat-Nicotinamid fand, konnte ich in mehreren Versuchsansätzen zeigen, daß auch die α -Ketogruppe reduziert wird. Um den Anteil an 5- α -Hydroxybutyrat-Nicotinamid möglichst gering zu halten, wurde bei größeren Ansätzen (ca. 4 g des Kaliumsalzes der ungesättigten Säure) die hydrierten, gut löslichen Verbindungen aus dem Reaktionsansatz durch Abfiltrieren vom Katalysator und der schlecht löslichen ungesättigten Säure nach jeweils einer Stunde entfernt. Auf diese Art läßt sich gleichzeitig verhindern, daß durch längeres Hydrieren der gut löslichen 5- α -Ketobutyrat- und 5- α -Hydroxybutyrat-Nicotinamide zusätzlich noch am Aromaten hydriert wird.

Durch Säulenchromatographie an einem Anionenaustauscher lassen sich die beiden Säuren, die unterschiedliche pk-Werte haben, gut voneinander trennen (Abb.5).

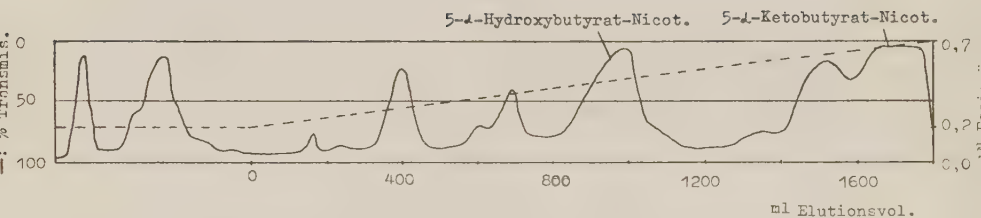


Abb. 5: Elutionsdiagramm von 5- α -Ketobutyrat- und 5- α -Hydroxybutyrat-Nicotinamid

Eine Synthese von 5- α -Hydroxybutyrat-Nicotinamid, bei der die Gefahr der Hydrierung des aromatischen Ringes nicht besteht, stellt die Reduktion von 5- α -Ketobutyrat-Nicotinamid mit Natriumborhydrid dar. Hierbei wird in wässrigem Medium nur die Carbonyl-Gruppe reduziert, analog der von Reid und Siegel (25) durchgeführten Reduktion von Brenztraubensäure zur Milchsäure.

Die NMR-Spektren der beiden Verbindungen zeigen deutlich die unterschiedliche Struktur der Seitenketten am C-5 des Nicotinamidteils an (Abb. 6 und 7).

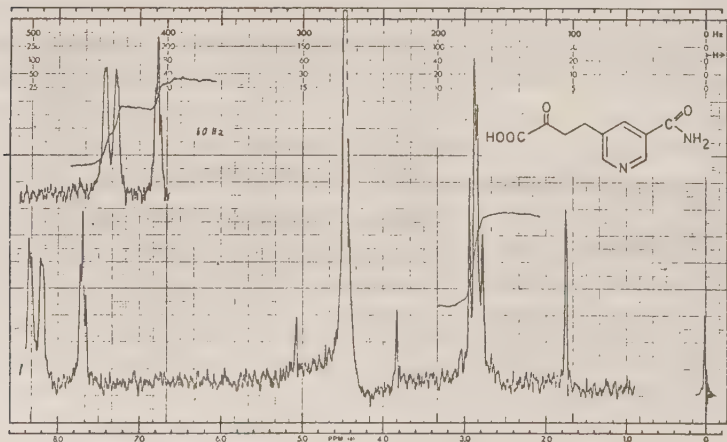


Abb. 6: NMR-Spektrum von 5- α -Ketobutyrat-Nicotinamid

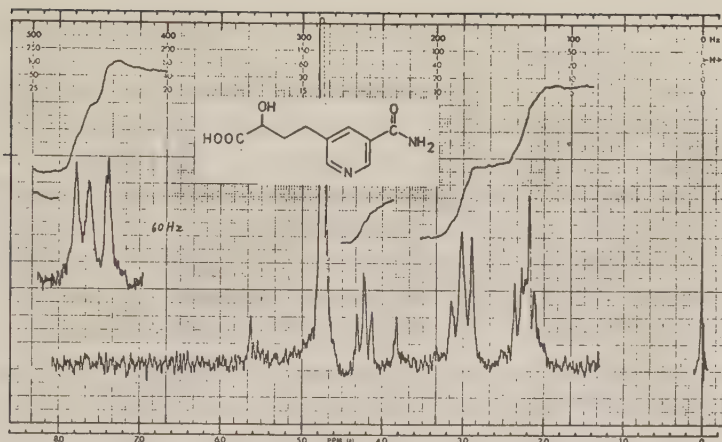


Abb. 7: NMR-Spektrum von 5- α -Hydroxybutyrat-Nicotinamid

Die Signale der beiden Methylen-Gruppen im α -Ketobuttersäure-Rest des 5- α -Ketobutytrat-Nicotinamids kommen als gemeinsames Multiplett bei 3 ppm, was darauf zurückzuführen ist, daß die Verschiebung durch die Nachbargruppen gleich groß ist. Die entsprechenden Methylen-Gruppen des 5- α -Hydroxybutyrat-Nicotinamids erscheinen dagegen als Triplet bei 3 ppm ($-\text{CH}_2-$ benachbart dem Pyridinring) und als Multiplett bei 2,2 ppm ($-\text{CH}_2-$ benachbart der Hydroxylgruppe) aufgrund des Fehlens der stark verschiebenden Carbonylgruppe. Das zusätzliche Triplet bei 4,2 ppm ist dem Proton des α -C-Atoms von dem α -Hydroxybuttersäure-Rest zuzuordnen, das mit den beiden Protonen koppelt.

Im aromatischen Bereich haben sowohl beim 5- α -Ketobutytrat- als auch beim 5- α -Hydroxybutyrat-Nicotinamid alle drei Protonen des Pyridinringes Signale mit unterschiedlicher Verschiebung. Die Feinstruktur der Signale ist auf allylische Kopplung zurückzuführen.

2.1.3. Dünnschichtchromatographie und elektrophoretische Reinheitsprüfung

Neben spektroskopischen und elementaranalytischen Methoden wurden auch chromatographische und elektrophoretische Methoden zur Reinheitsprüfung der Nicotinamid-Derivate angewandt. Die Dünnschichtchromatographie wurde auf analytischen Kieselgelplatten mit drei verschiedenen Laufmitteln durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, daß die Verbindungen sauber sind. Die R_F -Werte sind in Tabelle 1 eingetragen.

In der Hochspannungselektrophorese auf Whatman-Papier wandern alle drei Verbindungen in einem Puffersystem pH 4,6 aufgrund ihrer sauren Gruppen zur Anode. Eine Verunreinigung ist dabei nicht zu erkennen. Die Wanderungsgeschwindigkeiten sind ebenfalls in Tabelle 1 eingetragen.

Tab. 1: R_F -Werte in der Dünnschichtchrom. und elektrophoretischen Beweglichkeit

	Ath./NH ₄ Ac 1 : 1	Isob./NH ₃ /H ₂ O 66 : 1 : 33	Prop./NH ₃ /H ₂ O 20 : 12 : 3	Wand.-Gesch. cm ² /V.sec
5- α -Ketobutytrat-Nicotinamid	0,77	0,44	0,51	15,7 x 10 ⁻⁶
5- α -Hydroxybut.-Nicotinamid	0,70	0,47	0,49	10,9 x 10 ⁻⁶
4-(5-Carboxamido-3-pyridyl)-2-oxobut-3-en-säure	0,72	0,44	0,44	---

2.2.0. Synthese der NAD- und NADH-Derivate

Die folgende Abbildung gibt einen Überblick von dem Syntheseweg.

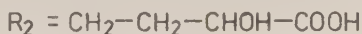
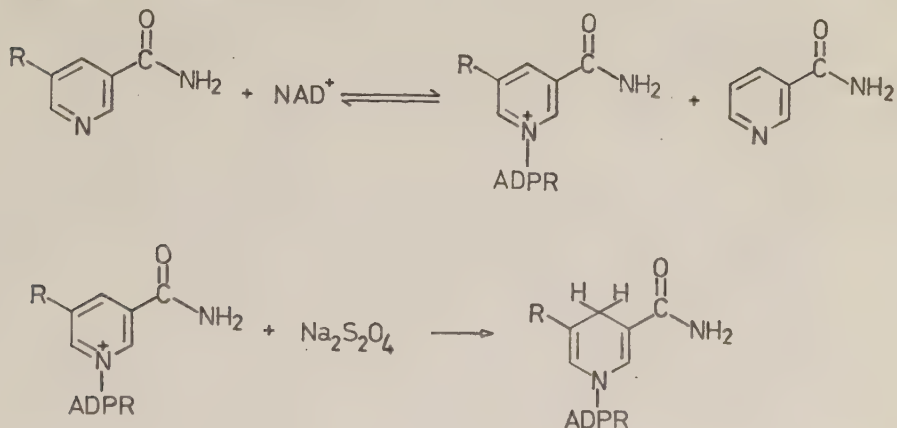


Abb. 8: Reaktionsschema der Synthese von NAD- und NADH-Derivaten

2.2.1 Synthese von 5- α -Ketobutyrat-NAD

Wie schon erwähnt, lassen sich am Pyridinring modifizierte NAD-Analoga durch die von der NAD-Glycosidase katalysierten Transglycosidierung aus NAD herstellen, wenn ein entsprechender Überschuß des Pyridinderivats eingesetzt wird. Dieser Überschuß lag bei der Synthese von 5-Carboxy-NAD (26) bei der 40fachen Menge, wurde aber wegen der schwierigeren Synthese von 5- α -Ketobutyrat-Nicotinamid auf die 3fache molare Menge, bezogen auf die molare NAD-Menge, herabgesetzt.

Nach 3 Stunden Inkubationszeit war bis zu 75 % der eingesetzten NAD-Menge gespalten. Dieser Wert, der sich danach kaum noch änderte, wurde enzymatisch durch Reduktion eines aliquoten Anteils mit Athanol unter Katalyse von der ADH bestimmt. Da 5- α -Ketobutyrat-NAD sich unter diesen Bedingungen nicht reduzieren läßt (siehe enzymatische Untersuchungen in Absch. 3.2.1.), entsprachen die gemessenen Werte nur der vorhandenen NAD-Menge.

Das entstandene 5- α -Ketobutyrat-NAD wurde durch Säulenchromatographie an einem Anionenaustauscher von den übrigen Verbindungen abgetrennt. Eluiert man mit einem Konzentrationsgradienten von Ammoniumacetat, der sich bei 5-Carboxy-NAD wegen des neutralen pH-Wertes als günstig erwiesen hat, zersetzte sich 5- α -Ketobutyrat-NAD nachträglich stark beim Lyophilisieren. Die Ursache mag in der allgemeinen Labilität von Brentraubensäure gegenüber Ammonium-Ionen zu suchen sein. Mit Essigsäure läßt sich 5- α -Ketobutyrat-NAD selbst bei einer 3 M Lösung nicht eluieren, was auf die drei stark sauren Gruppen zurückzuführen ist. Mit einem Ameisensäure-Gradienten erschien 5- α -Ketobutyrat-NAD bei einer 1,0 M Ameisensäure-Konzentration im Eluat (Abb.9).

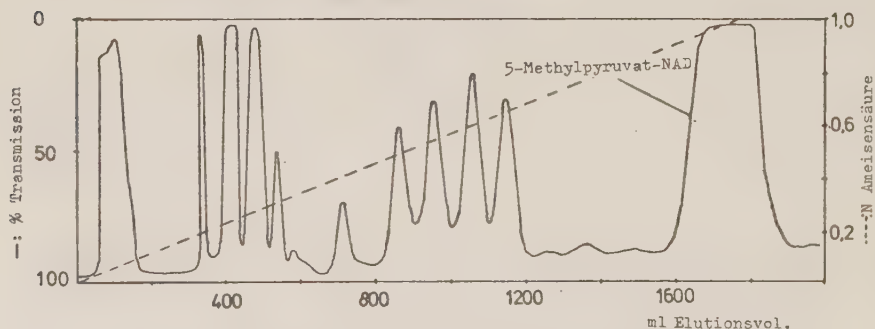


Abb. 9: Elutionsdiagramm von 5- α -Ketobutyrat-NAD

Obwohl nur mit einem 3fachen Überschuß an Pyruvat-Derivat gearbeitet worden ist, lag die Ausbeute an 5- α -Ketobutyrat-NAD doch bei 36 %, bezogen auf die eingesetzte NAD-Menge. Die Struktur des 5- α -Ketobutyrat-NAD's wie sie in Abb. 10

dargestellt ist, wurde durch folgende Versuche bewiesen:

- 1.) Die isolierte Verbindung zeigte die für quartäre Pyridinium-Verbindungen typische Addition von Cyanid- und Sulfitionen (siehe dazu Abschnitt 2.2.5.).
- 2.) Durch Rückspaltung mit 0,1 N NaOH (27) oder enzymatischer Spaltung mit NAD-Glycohydrolase (28) entstand wieder das Nicotinamid-Derivat und zusätzlich der ADPR-Rest. Beide Verbindungen wurden über ihre R_F -Werte dünnschichtchromatographisch identifiziert.
- 3.) Einen eindeutigen Beweis stellte das Ergebnis der Elementaranalyse dar. Nach zweimaligem Ausfällen aus Wasser mit Aceton und Trocknen bei Raumtemperatur im Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz ergaben sich die folgenden Werte bei einem Molekulargewicht von $C_{25}H_{31}N_7O_{17}P_2 = 763,5$

Ber.: C 39,33 H 4,05 N 12,84 P 8,11

Gef.: C 39,50 H 4,16 N 12,80 P 7,99

Wie aus der Analyse hervorgeht, sind weder Wasser noch Aceton mit auskristallisiert. Weitere Reinheitsprüfungen durch Dünnschichtchromatographie und Hochspannungselektrophorese sind in Abschnitt 2.2.4. beschrieben.

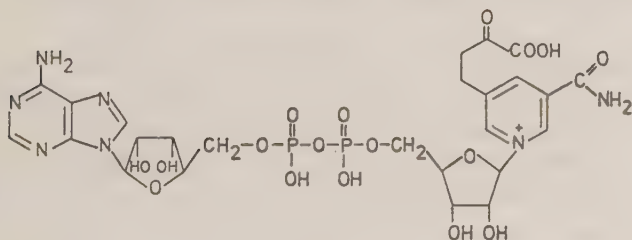


Abb. 10: Struktur von 5- α -Ketobutyrat-NAD

2.2.2. Synthese von 5- α -Hydroxybutyrat-NAD

Auf gleiche Art wie 5- α -Ketobutytrat-NAD wurde auch 5- α -Hydroxybutyrat-NAD (Abb.8) synthetisiert. Der Überschuß an 5- α -Hydroxybutyrat-Nicotinamid wurde hierbei sogar auf die 2fache molare Menge gegenüber NAD herabgesetzt. Wie schon bei der Transglycosidierung von 5- α -Ketobutytrat-Nicotinamid war auch diesmal nach ca. 3 Stunden keine weitere Verschiebung des Gleichgewichts zur Seite des NAD-Derivats zu beobachten. Das gebildete 5- α -Hydroxybutyrat-NAD wurde wiederum durch Säulenchromatographie an einem Anionenaustauscher (Formiat-Form) gereinigt. Es ergab sich das folgende Elutionsdiagramm:

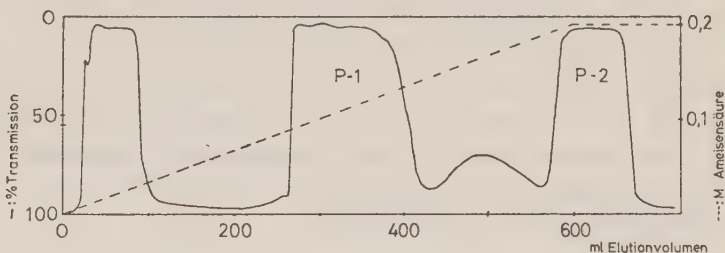


Abb. 11: Elutionsdiagramm von 5- α -Hydroxybutyrat-NAD

Der bei 0,1 - 0,13 M Ameisensäure erscheinende, breite Peak P1) enthält die beiden Ausgangsverbindungen 5- α -Hydroxybutyrat-Nicotinamid und NAD. Dies ergaben dünnschichtchromatographische Untersuchungen. Die beiden Verbindungen wurden anschließend auf einem Sephadex Anionenaustauscher (Acetat-Form) säulenchromatographisch mit einem linearen Essigsäuregradienten voneinander getrennt.

5- α -Hydroxybutyrat-NAD erschien bei 0,2 M Ameisensäure (P2) im Eluat. Zum Strukturbeweis wurden die gleichen Nachweise wie bei 5- α -Ketobutytrat-NAD durchgeführt, d.h. Addition von Cyanid-

und Sulfit-Ionen sowie Rückspaltung zum 5- α -Hydroxybutyrat-Nicotinamid und dünnschichtchromatographischer Vergleich mit den Ausgangsverbindungen. Die Ergebnisse der Elementaranalyse zeigen, daß 5- α -Hydroxybutyrat-NAD nach dem Ausfällen aus Wasser mit Aceton zwei Mole Kristallwasser enthält. Bezogen auf das Molekulargewicht $C_{25}H_{33}N_7O_{17}P_2 \times 2H_2O$ ergaben sich folgende Werte:

Ber.: C 37,43 H 4,62 N 12,23 P 7,73

Gef.: C 37,23 H 5,08 N 12,12 P 6,90

In Abb. 12 ist die Strukturformel von 5- α -Hydroxybutyrat-NAD abgebildet:

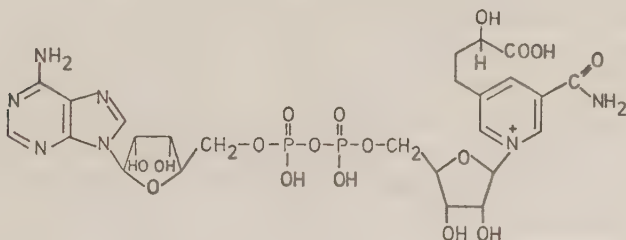


Abb. 12: Strukturformel von 5- α -Hydroxybutyrat-NAD

Reinheitsprüfung durch Dünnschichtchromatographie und Hochspannungselektrophorese sind in Abschnitt 2.2.4 beschrieben. An dieser Stelle sei schon darauf hingewiesen, daß dieses durch Transglycosidierung erhaltene 5- α -Hydroxybutyrat-NAD identisch ist mit dem Produkt der intramolekularen Hydridübertragung bei 5- α -Ketobutyryl-NADH mit der LDH. Das enzymatisch aus dem 5- α -Ketobutyryl-NADH erhaltene 5- α -Hydroxybutyrat-NAD wurde unter gleichen säulenchromatischen Bedingungen gereinigt und isoliert.

2.2.3 Chemische Reduktion von NAD-Derivaten

Quartäre Pyridinium-Verbindungen lassen sich leicht zu den entsprechenden Dihydropyridinen reduzieren. Besonders schonend ist die von Gutcho (29) ausführlich beschriebene Methode der Reduktion von NAD mit Dithionit (Abb.8). In Analogie dazu wurden 5- α -Ketobutyrat-NAD und 5- α -Hydroxybutyrat-NAD sowie das 5-Carboxy-NAD durch kurzes Aufkochen in wässriger Lösung mit Dithionit reduziert (100°C, 1 min.). Kontrollversuche zeigten, daß die Carbonyl-Gruppe im 5- α -Ketobutyrat-NAD unter diesen Bedingungen nicht reduziert wird.

Zur Reinigung von NADH und NADH-Derivaten ist in der Literatur hauptsächlich die Chromatographie an DEAE-Zellulose beschrieben (30,31). Eluiert wird in der Regel mit Ammoniumhydrogencarbonat, das anschließend durch Lyophilisation entfernt werden kann. Da Brenztraubensäure-Derivate gegenüber Ammonium-Ionen labil sind, konnte Ammoniumhydrogencarbonat als Elutionsmittel nicht verwendet werden. Andererseits haben schon Kaplan und Mitarbeiter (32) gezeigt, daß sich NADH im gefrorenen Zustand zersetzt. Unter Berücksichtigung dieser Punkte wurden die NADH-Derivate durch Säulenchromatographie an einem Sephadex-Anionenaustauscher (C1-Form) mit einem linearen LiCl-Gradienten gereinigt. Abbildung 13 zeigt die Elutionsdiagramme der drei NADH-Derivate.

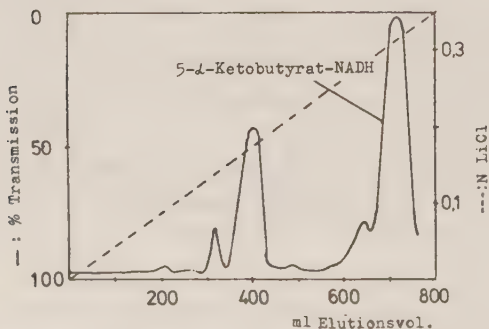


Abb. 13a: Elutionsdiagramm von 5- α -Ketobutyrat-NADH

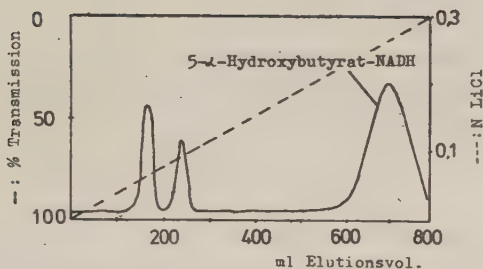


Abb. 13b: Elutionsdiagramm von 5- α -Hydroxybutyrat-NADH

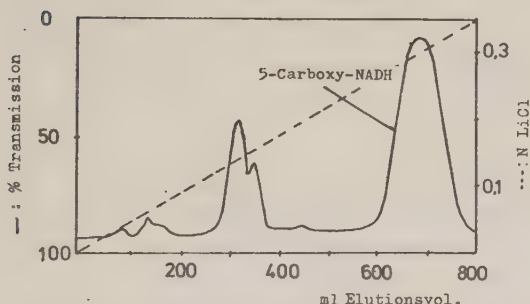


Abb. 13c: Elutionsdiagramm von 5-Carboxy-NADH

Die NADH-Derivate wurden durch ihr charakteristisches UV-Spektrum mit dem zweiten Absorptionsmaximum bei 340 bzw. 360 nm erkannt. Zur Isolierung wurden die entsprechenden Fraktionen bei 0,3 Torr und Raumtemperatur auf ca. 1 ml am Rotationsverdampfer eingedunstet. Da LiCl in Isopropanol löslich ist, die NADH-Derivate aber nicht, konnten auf diese Art die NADH-Derivate isoliert werden.

Der Nachweis der Einheitlichkeit der Produkte wurde dünn-schichtchromatographisch und elektrophoretisch durchgeführt. (Siehe dazu Abschnitt 2.2.4.)

2.2.4. Chromatographische und elektrophoretische Eigenschaften der NAD- und NADH-Derivate

Die Dünnschichtchromatographie auf analytischen Kieselgelplatten wurde mit verschiedenen Laufmitteln durchgeführt. Am besten eigneten sich die Laufmittel:

A) Isopropanol/konz.NH₃/H₂O (66 : 1 : 33) pH 4

B) Äthanol/1 M NH₄Ac (1 : 1) pH 6

C) Propanol/konz.NH₃/H₂O (20 : 12 : 3) pH 8

In diesen Laufmitteln, die alle unterschiedliche pH-Werte haben, bewegen sich alle Verbindungen vom Start weg. Da die NAD- und NADH-Derivate untereinander die gleiche Ladung besitzen, unterscheiden sich ihre R_F-Werte auch nur sehr wenig. Gegenüber NAD und NADH ist aber ein deutlicher Unterschied zu sehen.

Bei der Hochspannungselektrophorese auf Whatman-Papier macht sich dieser Unterschied in der Ladung noch deutlicher erkennbar. Alle Verbindungen bewegen sich zur Anode, die NADH-Derivate weiter als NADH und die NAD-Derivate ebenfalls weiter als NAD. Die R_F-Werte und die Wanderungsgeschwindigkeiten sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Die Flecke von NADH und den NADH-Derivaten fluoreszieren im UV-Licht der Wellenlänge 254 nm, die von NAD und den NADH-Derivaten erst nachdem sie eine Stunde in einer Atmosphäre aus Butan-2-on und konz.NH₃ gelegen hatten. Bei dieser Behandlung findet eine Addition am C-4 des Nicotinamidringes statt, wodurch die fluoreszierenden Dihydropyridin-Derivate entstehen (33).

Verunreinigungen mit unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeit oder anderem R_F-Wert waren nicht in nennenswertem Ausmaß zu erkennen, außer im käuflichen NAD Reinheitsstufe III.

Tab. 2: R_F -Werte und elektrophoretische Wanderungsgeschwindigkeit von NAD- und NADH-Derivaten sowie NAD und NADH

	Ath/ NH_4Ac 1 : 1	Isob/ $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ 66 : 1 : 33	Prop/ $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ 20 : 12 : 3	Wand.-Gesch. $\text{cm}^2/\text{V sec}$
5- α -Ketobut. -NAD	0,62	0,23	0,24	$9,3 \times 10^{-6}$
5- α -Ketobut. -NADH	0,75	0,32	0,36	$14,1 \times 10^{-6}$
5- α -Hydroxyb. -NAD	0,62	0,23	0,23	---
5- α -Hydroxyb. -NADH	0,75	0,27	0,33	---
5-Carboxy- NAD	0,67	0,26	0,24	$10,6 \times 10^{-6}$
5-Carboxy- NADH	0,74	0,27	0,34	$14,2 \times 10^{-6}$
NAD	0,55	0,31	0,20	$4,2 \times 10^{-6}$
NADH	0,74	0,32	0,38	$7,7 \times 10^{-6}$

2.2.5. Additionsverbindungen der NAD-Derivate

Schon 1938 berichtete Meyerhof (34), daß NAD mit Cyanid- und Sulfit-Ionen eine Verbindung mit charakteristischer Lichtabsorption im Gebiet von 320 - 340 nm eingeht. Durch die nucleophile Addition des Cyanid- bzw. Sulfit-Ions am C-4 des Nicotinamidringes entsteht die Dihydropyridin-Struktur des NAD's.

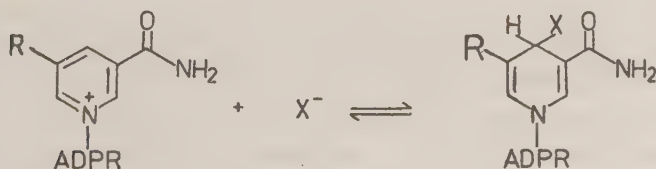


Abb. 14: Nucleophile Addition an NAD-Derivaten

Die Additionsverbindungen haben im Bereich um 330 nm ein zweites Absorptionsmaximum aufgrund des Dihydropyridinrings. Gleichzeitig wird das Absorptionsmaximum bei 260 nm niedriger, da nur noch der Adenin-Teil in diesem Bereich absorbiert. In Tabelle 3 sind die Absorptionsmaxima der Cyanid- und Sulfit-Additionsverbindungen zusammengestellt. Zum Vergleich sind auch NAD und 5-Carboxy-NAD mit aufgeführt.

Tab. 3: Lage der Absorptionsmaxima der Additionsverbindungen

	meth.CN-Lsg. (nm)	wäs.1M CN-Lsg. (nm)	1M NaHSO ₃ -Lsg. (nm)	0,1M NaOH (nm)
5- α -Ketobut. -NAD	258 / 325	258 / 330	258 / 323	258 / -
5- α -Hydroxyb. -NAD	258 / 327	258 / 330	258 / 323	258 / -
5-Carboxy- NAD	258 / 335	258 / 335	258 / 330	258 / 335
NAD	258 / 325	258 / 325	258 / 320	258 / -

Während die Additionsverbindungen von 5- α -Ketobutytrat-NAD und 5- α -Hydroxybutytrat-NAD kaum eine Veränderung der Lage des zweiten Absorptionsmaximums gegenüber dem NAD zeigen, ist beim 5-Carboxy-NAD eine deutliche Verschiebung zu höheren Wellenlängen zu beobachten. Dies ist dadurch zu erklären, daß die Carboxyl-Gruppe des 5-Carboxy-NAD's in Konjugation mit den Doppelbindungen des Dihydropyridinrings steht, während bei 5- α -Ketobutytrat- und 5- α -Hydroxybutytrat-NAD dies wegen der dazwischen liegenden Methylen-Gruppen nicht der Fall ist.

Eine nucleophile Addition in 0,1 N NaOH-Lösung, wie sie beim 5-Carboxy-NAD stattfindet, ist wegen der größeren Elektronendichte im Pyridinring des 5- α -Ketobutytrat- und 5- α -Hydroxybutytrat-NAD's nicht möglich. Der zusätzliche Butytrat-Rest besitzt

einen +I-Effekt, so daß der Pyridinring sogar gegenüber dem einfach substituierten Pyridinring im NAD langsamer nucleophil angegriffen wird. Diese Tatsache macht sich auch daran bemerkbar, daß in einer 0,1 N NaHSO_3 -Lösung das Gleichgewicht der Sulfite-Addition an 5-Carboxy-NAD und NAD vollständig auf der Seite der Additionsverbindung liegt, bei 5- α -Ketobutyrate- und 5- α -Hydroxybutyrat-NAD ist dies dagegen erst bei einer 1 N-Sulfite-Lösung der Fall.

Die im folgenden Abschnitt beschriebene Bestimmung des Redoxpotentials über die Gleichgewichtskonstante der Cyanid-Addition zeigt die Unterschiede in der Elektronendichte der Pyridinringe recht deutlich.

2.2.6 Redoxpotentiale der NAD-Derivate

Aus Gleichgewichtsmessungen enzymatischer Reaktionen läßt sich das Redoxpotential des NAD-NADH-Systems bestimmen (35,36). Da bei der Cyanid-Addition statt eines Hydrid-Ions H^- ein Cyanid-Ion CN^- auf das NAD übertragen wird, zeigte Wallenfels und Mitarbeiter (37), daß sich das Redoxpotential E_0 von Pyridinium-Verbindungen, die enzymatisch nicht reduziert werden, bei denen aber eine Cyanid-Addition möglich ist, über die Gleichgewichts-Konstante K_A der Cyanid-Addition bestimmen läßt.

$$E_0 \approx \lg K_A$$

Mit Hilfe der bekannten Werte für E_0 (ber. nach der Enzymreaktion) und K_A von NAD (35) und APAD (15) läßt sich eine Eichgrade aufstellen, aus der dann bei bekanntem K_A -Wert einer Pyridinium-Verbindung das entsprechende Redoxpotential abgelesen werden kann.

Nach diesem Verfahren wurden die Redoxpotentiale von 5- α -Keto-butyrat-NAD, 5- α -Hydroxybutyrat-NAD und 5-Carboxy-NAD bestimmt.

Die Gleichgewichtskonstante der Cyanid-Addition:

$$K_A = \frac{[P-CN]}{[P^+] \times [CN^-]}$$

wird, wie in Abschnitt 6.9.0. (Material und Methoden) beschrieben, über die Messung der Konzentrationen an $[P-CN]$ und $[P^+]$ im Gleichgewicht bestimmt. In Tabelle 4 sind die gemessenen K_A -Werte und die sich daraus ergebenden Redoxpotentiale E_o der NAD-Derivate eingetragen.

Tab. 4: Redoxpotentiale der NAD-Derivate

	K_A	$\lg K_A$	E_o
5- α -Ketobut.- NAD	90 M ⁻¹	1,954	-331 mV
5- α -Hydroxyb.- NAD	43 M ⁻¹	1,633	-340 mV
5-Carboxy- NAD	1635 M ⁻¹	4,213	-262 mV
NAD	188 M ⁻¹	2,274	-319 mV

Die Redoxpotentiale bestätigen, was schon im vorangegangenen Abschnitt qualitativ zu erkennen war, daß die Affinität für Anionen (CN^- , HSO_3^- , OH^- und H^-) bei 5- α -Ketobutyryl-NAD und 5- α -Hydroxybutyryl-NAD geringer als bei NAD und 5-Carboxy-NAD ist. Auf die enzymatische Reduktion bezogen, sagen die Redoxpotentiale aus, daß das Gleichgewicht bei der Reduktion von 5-Carboxy-NAD weiter auf der Seite des reduzierten 5-Carboxy-NADH's liegen sollte, verglichen mit NAD. Für 5- α -Ketobutyryl-NAD und 5- α -Hydroxybutyryl-NAD sollte wegen

des negativen Redoxpotentials gegenüber NAD das Gleichgewicht weiter auf der Seite der oxydierten Verbindungen liegen.

Inwieweit das Redoxpotential der NAD-Derivate Einfluß auf das Verhalten bei enzymatisch katalysierten Reaktionen hat, wird später diskutiert.

2.2.7. UV- und Fluoreszenz-Spektren der NADH-Derivate

Die NADH-Derivate haben aufgrund ihrer Dihydropyridin-Struktur ein zweites Absorptionsmaximum bei 340 - 360 nm. In Tabelle 5 sind die Wellenlängen der Absorptionsmaxima und die dazugehörigen Extinktionskoeffizienten eingetragen.

Tab. 5: Absorptions- und Fluoreszenz-Maxima der NADH-Derivate

	UV-Absorption $\lambda_{\max}$ nm; (lg)	Fluoreszenz-Werte		
		Anr.Max.	Emis.Max.	Intensität*
5- α -Ketobut.-NADH	258(4,15) 342(3,78)	342nm	462nm	24
5-Carboxy-NADH	258(4,26) 360(3,64)	360nm	459nm	210
NADH	258(4,15) 340(6,18)	340nm	462nm	100
5- α -Hydroxyb.-NADH	258(4,17) 342(3,80)	--	--	--

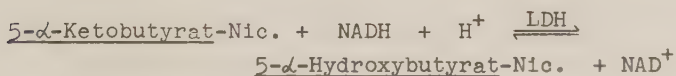
*Relative Intensität der Emission bezogen auf NADH-Intensität 100

Neben den charakteristischen UV-Absorptionen, tritt bei den NADH-Derivaten auch Fluoreszenz auf. Die Fluoreszenz-Daten befinden sich ebenfalls in Tabelle 5. Da das Anregungsmaximum dem Absorptionsmaximum im UV-Bereich entspricht, findet man die gleiche Verschiebung zu größeren Wellenlängen. Das Maximum der Emission ist demgegenüber kaum verändert. Dagegen treten bei gleicher Konzentration an NADH und NADH-Derivaten starke Unterschiede in der relativen Intensität der Emission bei Anregung im jeweiligen Maximum auf. Während bei 5-Carboxy-NADH die relative Intensität der Emission doppelt so groß wie bei NADH ist, zeigt 5- α -Ketobutyrat-NADH nur 1/4 der relativen Intensität verglichen mit NADH (siehe letzte Spalte in Tab. 5).

3.0.0. Biochemische Eigenschaften der Nicotinamid-, NAD- und NADH-Derivate

In biochemischer Hinsicht lassen sich die von mir synthetisierten Nicotinamid-, NAD- und NADH-Derivate in drei Gruppen unterteilen:

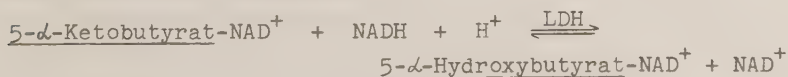
A) Zur ersten Gruppe gehören solche Verbindungen, die nur substratanalog von der LDH umgesetzt werden können, also 4- (5-Carb-amido-3-pyridyl)-2-oxo-but-3-en-säure, 5- α -Ketobutyrat-Nicotinamid und 5- α -Hydroxybutyrat-Nicotinamid. Diese Verbindungen sind Homologe der natürlichen Substrate der LDH. Sie tragen am C-3-Atom der α -Ketosäure- bzw. α -Hydroxysäure-Gruppe einen Nicotinyl-Rest. Die Reaktionsgleichung der substratanalogen Umsetzung lautet:



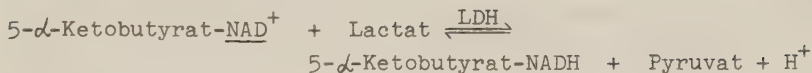
Die Reaktion läßt sich durch die Absorptionsänderung beim Übergang $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}$ verfolgen. Im ersten Abschnitt des biochemischen Teils meiner Arbeit wird die substratanaloge Umsetzung der Nicotinamid-Derivate in Gegenwart der LDH untersucht.

B) 5- α -Ketobutyrat-NAD ist ein Coenzym-Substrat-Modell, bei dem Coenzym- und Substrat-Teil beide in der oxydierten Form vorliegen, so daß eine intramolekulare Hydridübertragung nicht möglich ist. Bei Zugabe von Lactat bzw. NADH sollte aber eine coenzymanaloge bzw. substratanaloge Umsetzung von der LDH katalysiert werden.

Substratanaloge Reaktion:



Coenzymanaloge Reaktion:



Auch mit anderen NAD-abhängigen Dehydrogenasen sollte bei Anwesenheit des jeweiligen Substrats eine coenzymanaloge Reduktion von 5- α -Ketobutyrat-NAD möglich sein. Mit diesen Fragen befassen sich die biochemischen Untersuchungen des 5- α -Ketobutyrat-NAD's in Abschnitt 3.2.0.

C) 5- α -Ketobutyrat-NADH ist dagegen ein Coenzym-Substrat-Modell, bei dem das oxydierte Substrat der LDH kovalent an das reduzierte Coenzym gebunden ist. Damit stellt sich die zentrale Frage, ob die LDH eine intramolekulare Hydridübertragung katalysiert.

Intramolekulare Hydridübertragung katalysiert durch die LDH:



Auch die L-Alanin-Dehydrogenase sollte die Hydridübertragung katalysieren.

Intramolekulare Hydridübertragung katalysiert von der L-Alanin-DH:



Eine in Mikroorganismen vorkommende D-LDH, die aus Pyruvat das D-Lactat herstellt, sollte nach den bisher bekannten Daten (70) die intramolekulare Hydridübertragung nicht katalysieren, da die Orientierung von Substrat und Coenzym im ternären Komplex anders als bei der LDH sein muß.

Um die Spezifität des 5- α -Ketobutyrat-NADH's zu zeigen, wurde auch untersucht, ob andere NAD-abhängige Dehydrogenasen, die pyruvatähnliche Substrate reduzieren, ebenfalls eine intramolekulare Hydridübertragung katalysieren. Zu diesen Dehydrogenasen zählt die MDH.

Im 5- α -Hydroxybutyrat-NAD ist ebenfalls das entsprechende Redoxpaar kovalent aneinander gebunden, doch da NADH um den Faktor 300 fester als NAD von der LDH gebunden wird, ist eine intramolekulare Hydridübertragung in erster Linie bei 5- α -Keto-butyrat-NADH zu erwarten.

3.1.0. Biochemische Eigenschaften der Nicotinamid-Derivate

Die natürlichen Substrate der LDH sind Pyruvat und L-Lactat. In der Literatur findet man eine ganze Reihe von homologen α -Hydroxy- und α -Ketosäuren, die ebenfalls von der LDH als Substrat umgesetzt werden (38, 39). Vor allem sind es die α -Ketosäuren, die gut untersucht sind. So werden alle α -Ketosäuren mit einer Kettenlänge von 2 - 9 C-Atomen von der LDH umgesetzt, doch nimmt die Geschwindigkeit der Umsetzung ab einer Kettenlänge von 5 C-Atomen stark ab (40). Auch Pyruvat-Derivate, die am C-3 funktionelle Gruppen wie z.B. Phenyl-, Hydroxyl-, Fluor- oder Carboxyl-Reste tragen, werden als Substrate akzeptiert (41, 42). Die Anzahl der L- α -Hydroxy-homologen, die von der LDH als Substrat umgesetzt werden, ist dagegen kleiner. Von den L- α -Hydroxy-Säuren ist nur die L- α -Hydroxybuttersäure als Substrat beschrieben worden (39). β -Halogen, β -Hydroxy- und β -Amino-Lactat sind Substrate, bei denen der Umsatz auf 1/100 gegenüber Lactat herabgesetzt ist.

Während in einer anderen Arbeit (23) 5- α -Ketobutyrat- und 5- α -Hydroxybutyrat-Nicotinamid als Coenzym-Substrat-Komplex bezeichnet wurde, weil Nicotinamid ein Teil des Coenzym ist, zeigten die biochemischen Untersuchungen, daß diese Verbindungen nur in Gegenwart des Coenzym enzymatisch von der LDH reduziert bzw. oxidiert werden.

Zur Bestimmung der charakteristischen Größe $V_{\max}$ und K_M der Substrat-Analoga 5- α -Ketobutyrat-Nicotinamid und 4-(5-Carbox-amido-3-pyridyl)-2-oxo-but-3-en-säure ist die Anfangsgeschwindigkeit der Umsetzung in Abhängigkeit von der Konzentration der Substrat-Analoga gemessen worden. Durch die Auftragung der reziproken Werte nach Lineweaver-Burk (43) erhält man eine Gerade. Mit Hilfe der von Michaelis und Menten (44) aufgestellten Gesetze läßt sich aus der Geraden K_M (Abszissenabschnitt = $-1/K_M$) und $V_{\max}$ (Ordinatenabschnitt = $1/V_{\max}$) berechnen.

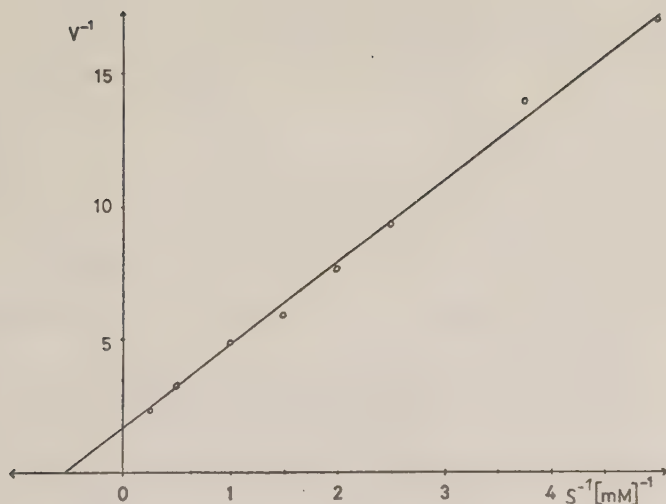


Abb. 15a: Kinetische Messungen mit 4-(5-Carboxamido-3-pyridyl)-2-oxo-but-3-en-säure als Substrat der LDH.

Es wurde die Extinktionsabnahme bei 366 nm von einer NADH-Lösung (0,18 mM) mit verschiedenen Substrat-Konzentrationen (4 - 0,2 mM) in 67 mM Phosphat-Puffer pH 7,2 bei 25°C gemessen. Katalysiert wurde die Reaktion von 40,47 µg/ml LDH H₄

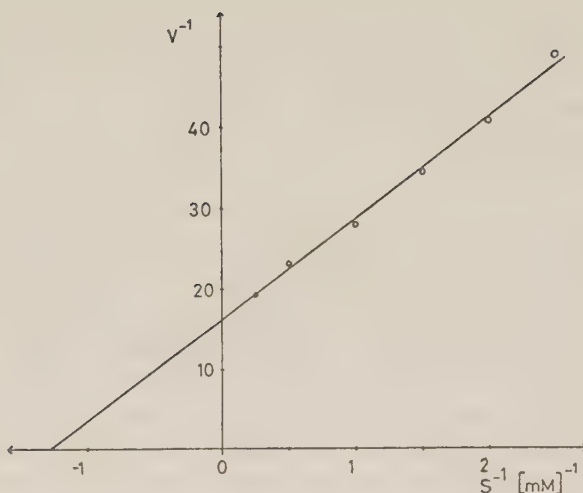


Abb. 15b: Kinetische Messungen mit 5- α -Ketobutyrat-Nicotinamid als Substrat der LDH.

Es wurde die Extinktionsabnahme bei 366 nm von einer NADH-Lösung (0,18 mM) mit verschiedenen Konzentrationen an 5- α -Ketobutyrat-Nicotinamid (4 - 0,4 mM) in 67 mM Phosphat-Puffer pH 7,2 bei 25 °C gemessen.

Katalysiert wurde die Reaktion von 226 $\mu\text{g/ml}$ LDH H_4 .

Tab. 6: K_M - und $V_{\max}$ -Werte der kinetischen Messungen

	K_M	$V_{\max} \left[\frac{\text{Mol (S)}}{\text{Mol (E) x min}} \right]$
4-(5-Carboxamido-3-pyridyl)-2-oxobut-3-en-säure	$18,87 \times 10^{-4} \text{ M}$	157,95
5- α -Ketobutyrat-Nicotinamid	$7,75 \times 10^{-4} \text{ M}$	2,951
Pyruvat	$0,595 \times 10^{-4} \text{ M}$	15307,0

In Tabelle 6 sind die K_M - und V_{max} -Werte zusammen mit denen von Pyruvat eingetragen. Man sieht, daß bei 5- α -Ketobutyrat-Nicotinamid der K_M -Wert um den Faktor 10, bei der ungesättigten Säure um den Faktor 30 größer ist als beim Pyruvat, d.h. die Affinität der LDH ist gegenüber diesen Nicotinamid-Derivaten um diesen Faktor geringer als gegenüber Pyruvat.

Betrachtet man die maximale Umsatzgeschwindigkeit, so findet man einen wesentlich größeren Unterschied zum natürlichen Substrat. V_{max} der ungesättigten Verbindung beträgt 1/100, V_{max} des 5- α -Ketobutyrat-Nicotinamids sogar 1/5000 gegenüber dem V_{max} -Wert des Pyruvats.

Ungefähr gleich große K_M - und V_{max} -Werte wie 5- α -Ketobutyrat-Nicotinamid zeigt das Substratanalogon o-Nitrophenyl-pyruvat (42). Dies ist auf die Ähnlichkeit der Struktur beider Substrat-Analoga zurückzuführen. Eine weitere gemeinsame Eigenschaft dieser beiden Verbindungen besteht darin, daß bei hohen Konzentrationen (2 - 20 mM) keine Substrat-Hemmung auftritt. Auch die 4-(5-Carboxamido-3-pyridyl)-2-oxo-but-3-en-säure bewirkt bei Konzentrationen der gleichen Größenordnung keine Hemmung der LDH H_4 . Pyruvat dagegen hemmt die LDH H_4 schon bei Konzentrationen größer als 0,8 mM. Die Hemmung kommt nach Kaplan und Mitarbeitern (45) dadurch zustande, daß Pyruvat mit NAD und LDH H_4 einen stabilen abortiven ternären Komplex bildet, aus dem heraus keine Umsetzung erfolgt. Das Ausbleiben der Hemmung bei den untersuchten Substrat-Analoga zeigt, daß wegen des sperrigen Nicotinamid-Restes, bzw. des o-Nitrophenyl-Restes ein solcher Komplex sich nicht bildet.

Auch das 5- α -Hydroxybutyrat-Nicotinamid wird von der LDH substratanalog umgesetzt. Da das Gleichgewicht der von der LDH katalysierten Reaktion weit auf der Seite des Lactats liegt, und Lactat gleichzeitig auch nicht so fest wie Pyruvat gebunden wird, war es nicht verwunderlich, daß die Oxydation von 5- α -Hydroxybutyrat-Nicotinamid im Vergleich zur Reduktion des 5- α -Ketobutyrat-Nicotinamid noch langsamer abläuft. Um einen meßbaren

Umsatz zu erreichen, wurde ein großer Überschuß an LDH zugegeben (ca. die 200fache Menge Enzym bezogen auf den Normaltest) und im alkalischen Medium pH 9,5 gearbeitet, um die entstehenden Protonen abzufangen. Die Zugabe von Hydrazin bewirkte die Entfernung des Ketons aus dem Gleichgewicht durch Reaktion zum Hydrazon.

Aber auch unter diesen Bedingungen beobachtet man nur eine langsame Oxydation, die auch in Gegenwart von Hydrazin nicht vollständig zum 5- α -Ketobutyrat-Nicotinamid abläuft. Die Oxydation des racemischen 5- α -Hydroxybutyrat-Nicotinamids findet unter gleichen Bedingungen auch mit der für D-Lactat spezifischen LDH (= D-LDH) statt. Wie in Abschnitt 3.3.1. gezeigt wird, ist dagegen die enzymatische Oxydation des optisch aktiven 5- α -(L-Hydroxybutyrat)-Nicotinamids nicht möglich.

Um quantitative Aussagen über die Eigenschaft des 5- α -Hydroxybutyrat-Nicotinamids zu treffen, müßte man, wie bei dem 5- α -Ketobutyrat-Nicotinamid beschrieben, kinetische Messungen durchführen. Da es sich bei dem chemisch synthetisierten 5- α -Hydroxybutyrat-Nicotinamid aber um ein racemisches Gemisch mit L- und D- α -Hydroxybuttersäure-Rest handelt, die LDH aber nur die L-Form umsetzt, wären die Ergebnisse nicht eindeutig. Diese Untersuchungen sollen im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt werden.

3.2.0. Biochemische Eigenschaften von 5- α -Ketobutyrat-NAD

Beim 5- α -Ketobutyrat-NAD handelt es sich um eine Verbindung, bei der Coenzym- und Substrat-Teil beide in der oxydierten Form vorliegen. Eine intramolekulare Reaktion ist daher ausgeschlossen. Es wurde aber untersucht, ob der Coenzym-Rest in Gegenwart von Lactat und der Substrat-Rest in Gegenwart von NADH von der LDH reduziert wird.

3.2.1. Untersuchungen zur Coenzymaktivität von 5- α -Ketobutyrat-NAD

In der Literatur sind eine ganze Reihe von NAD-Derivaten bekannt, bei denen die LDH ein Hydrid-Ion vom Lactat auf den Pyridinring überträgt und somit das NAD-Derivat enzymatisch reduziert. Dazu gehören neben der großen Anzahl von NAD-Derivaten, die einen veränderten Adeninteil besitzen (45, 46), auch einige, die am Nicotinamidring verändert sind. So werden fast alle NAD-Derivate enzymatisch reduziert, die statt der Amidgruppe einen anderen funktionellen Rest mit einem -I-Effekt haben, wie z.B. Acetylpyridin-AD (15) und 3-Cyanopyridin-AD (47).

Die Coenzymaktivität von 5- α -Ketobutyrat-NAD wurde an verschiedenen Dehydrogenasen getestet; an LDH, D-LDH, MDH und ADH aus Hefe und Pferdeleber. In Gegenwart des jeweiligen Substrats und einem großen Überschuß an Enzym (bis zur 200fachen Menge verglichen mit der im normalen Aktivitätstest) wurde keine Reduktion von 5- α -Ketobutyrat-NAD beobachtet, d.h. keine Extinktionsänderung bei 366 nm.

Da das Redoxpotential von 5- α -Ketobutyrat-NAD negativer und damit ungünstiger als das von NAD ist, wurde auch Zimtalkohol als Substrat der ADH aus Pferdeleber eingesetzt, weil die Oxydation des Zimtalkohols zum Zimtaldehyd energetisch günstiger ist als die Oxydation von Äthanol zu Acetaldehyd. Auf diese Weise konnte z.B. Biemann und Mitarbeiter (14) das 2-Methyl-NAD, das auch ein negativeres Redoxpotential als NAD besitzt, enzymatisch reduzieren.

Aber auch dieser Versuch zeigte, daß 5- α -Ketobutyrat-NAD nicht enzymatisch reduziert werden kann. 5-Carboxy-NAD wird, wie ich in meiner Diplomarbeit gezeigt habe, auch nicht enzymatisch reduziert und dies, obwohl das Redoxpotential positiver als das des NAD's ist. Somit zeigt auch der Vergleich mit 5-Carboxy-NAD, daß es nicht am Redoxpotential liegt, wenn 5- α -Ketobutyrat-

NAD nicht enzymatisch reduziert wird. Das Naheliegendste wäre die Vermutung, daß 5- α -Ketobutyrat-NAD nicht im aktiven Zentrum an die Coenzym-Bindungsstelle der Dehydrogenasen gebunden wird. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden kinetische Messungen mit 5- α -Ketobutyrat-NAD als Hemmstoff durchgeführt.

3.2.2. Art und Ausmaß der Hemmung verschiedener Dehydrogenasen mit 5- α -Ketobutyrat-NAD

Reversible Inhibitoren werden üblicherweise in kompetitive und nichtkompetitive Hemmstoffe unterteilt. Die Vorstellung über den Mechanismus der kompetitiven Hemmung geht dahin, daß der Hemmstoff reversibel an ein bestimmtes Zentrum des Enzyms gebunden wird, an das normalerweise der Reaktionspartner gebunden wird. Im Falle der kompetitiven Hemmung der Coenzym-Bindung konkurrieren zwei Komplexe E-NAD und E-Inhibitor miteinander, wobei nur der E-NAD-Komplex enzymatisch aktiv ist. Bei der nichtkompetitiven Hemmung wird der Inhibitor dagegen nicht an der Substrat- bzw. Coenzym-Bindungsstelle gebunden, so daß die Bildung des E-NAD-Komplexes nicht beeinflußt wird, wohl aber dessen Transformation.

In der Praxis kann man die idealen Grenztypen der Hemmung aus der graphischen Darstellung von $1/V$ gegen $1/NAD$ ermitteln. Da bei der nichtkompetitiven Hemmung der E-NAD-Komplex nicht beeinflußt wird, zeigen die Messungen mit und ohne Hemmstoff den gleichen K_M -Wert, aber unterschiedliche V_{max} -Werte. Bei der kompetitiven Hemmung liegt aufgrund des konkurrierenden E-Inhibitor-Komplexes erst bei höherer Substrat- bzw. Coenzym-Konzentration eine „Halbmaximale Substrat- bzw. Coenzymsättigung“ des Enzyms vor, d.h. der K_M -Wert verändert sich, während die maximale Umsatzgeschwindigkeit gleich bleibt.

Um zu erfahren, ob 5- α -Ketobutyrat-NAD im aktiven Zentrum an die Coenzym-Bindungsstelle gebunden wird, wurde die Hemmung

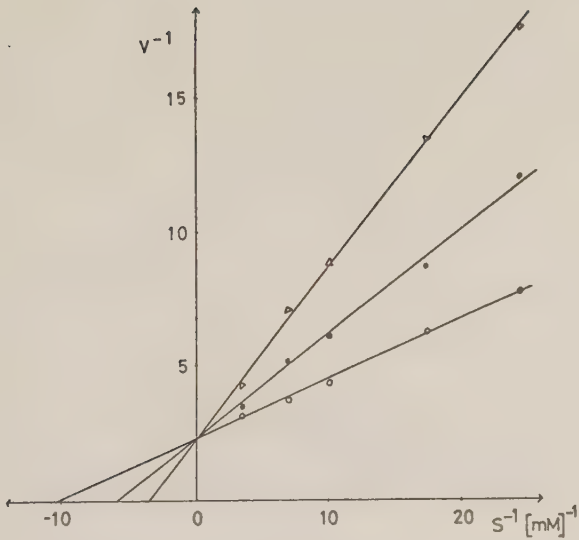


Abb. 16: Hemmung der LDH H_4 durch 5- α -Ketobutyrat-NAD
0,041 - 0,288 mM NAD, 36 mM L-Lactat (Na-Salz),
 $1,5 \times 10^{-3}$ mg/ml LDH H_4 (423 U/mg) in 0,1 M
Glycin-NaOH-Puffer pH = 9,5, 25°C.
○ ohne Inhibitor; ● 1 mM 5- α -Ketobutyrate-NAD;
△ 2 mM 5- α -Ketobutyrate-NAD.

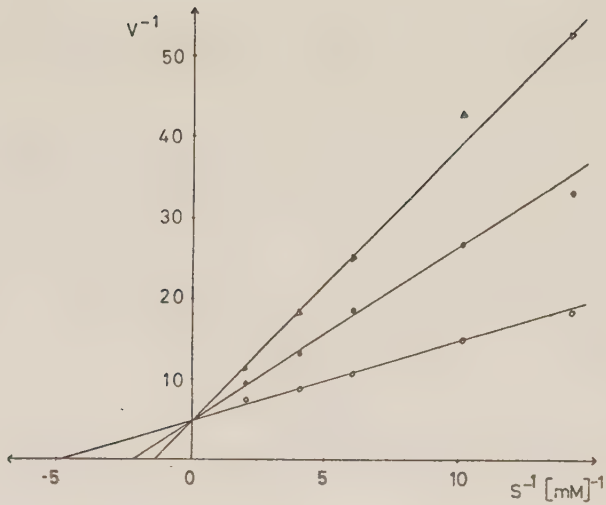


Abb.17: Hemmung der MDH durch 5- α -Ketobutyrat-NAD

0,070 - 0,493 mM NAD, 38 mM L-Malat (Na-Salz),
0,6 x 10⁻³ mg/ml MDH (770 U/mg) in 0,1 M
Glycin-NaOH-Puffer pH = 9,5, 25 °C.
○ ohne Inhibitor; ● 1 mM 5- α -Ketobutyrat-NAD;
▲ 2 mM 5- α -Ketobutyrat-NAD.

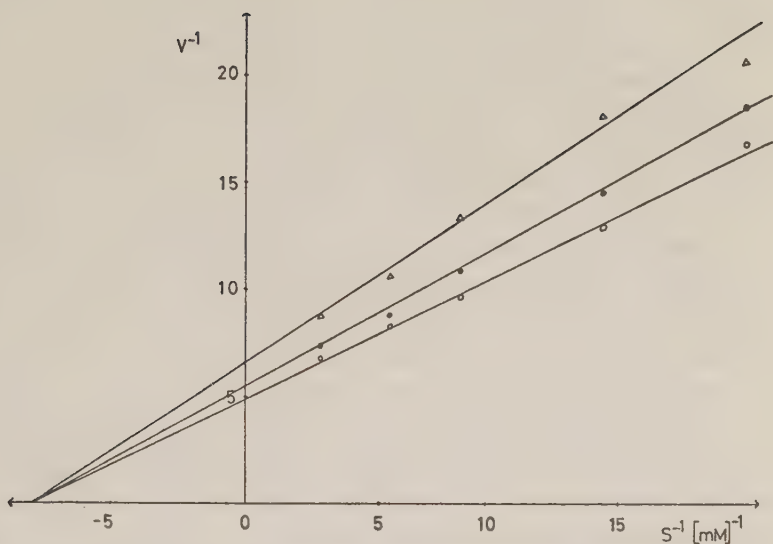


Abb. 18: Hemmung der ADH (Pferdeleber) durch 5- α -Ketobutyrate-NAD

0,054 - 0,374 mM NAD, 114 mM Äthanol, $1,4 \times 10^{-2}$ mg/ml ADH aus Pferdeleber (2,7 U/mg) in 0,01 M Pyrophosphat-Puffer pH = 8,0, 25 °C.

○ ohne Inhibitor; ● 1,6 mM 5- α -Ketobutyrate-NAD;

Δ 3,2 mM 5- α -Ketobutyrate-NAD.

Tab. 7: K_M - und K_I -Werte von LDH H_4 und MDH

	K_M für NAD	K_I für 5- α -Ketobut.-NAD
LDH H_4	$0,94 \times 10^{-4}$ M	$13,44 \times 10^{-4}$ M
MDH	$2,05 \times 10^{-4}$ M	$8,13 \times 10^{-4}$ M

von 5- α -Ketobutyrat-NAD bei der von LDH H_4 , MDH und ADH katalysierten Reaktion untersucht. Wie in Abbildung 16 zu sehen ist, handelt es sich bei der LDH um eine kompetitive Hemmung in bezug auf das Coenzym NAD, d.h. 5- α -Ketobutyrat-NAD wird an die Coenzym-Bindungsstelle der LDH gebunden.

Die in Tabelle 7 eingetragenen Inhibitor-Konstanten K_I geben die Affinität des Enzyms zum Hemmstoff an. Durch den Vergleich des K_I -Wertes mit dem unter gleichen Bedingungen ohne Hemmstoff gemessenen K_M -Wert läßt sich abschätzen, wie wirksam der Hemmstoff ist. Demnach ist die Bindung von 5- α -Ketobutyrat-NAD an die LDH um eine Zehnerpotenz schwächer verglichen mit NAD.

Die kinetischen Messungen mit MDH (Abb. 17) zeigen auch eine kompetitive Hemmung dieser Dehydrogenase durch 5- α -Ketobutyrat-NAD. Der K_I -Wert unterscheidet sich vom K_M -Wert nur noch um den Faktor 4, d.h. die MDH bindet 5- α -Ketobutyrat-NAD fester als die LDH, aber immer noch etwas schwächer als NAD.

Grundsätzlich anders verhält sich die ADH (Pferdeleber). Wie aus dem nichtkompetitiven Hemmtyp in Abbildung 18 zu sehen ist, wird 5- α -Ketobutyrat-NAD nicht im aktiven Zentrum an die Coenzym-Bindungsstelle gebunden. Diese Tatsache ist um so erstaunlicher, da gerade die ADH aus Pferdeleber ein verhältnismäßig unspezifisches Enzym ist, das, verglichen mit anderen Dehydrogenasen, sehr viele coenzymanalogue Verbindungen an Stelle von NAD bzw. NADH umsetzt.

Die ADH unterscheidet sich von der LDH und MDH im wesentlichen durch zwei Eigenschaften, sie besitzt im aktiven Zentrum ein Zn-Atom, das die Funktion der Bindung und Polarisation des Substrats hat (49, 50) und sie hat im Gegensatz zur LDH und MDH keinen Loop (55, 56). Aus den Ergebnissen der Röntgenstrukturanalyse und der Modifizierung der ADH weiß man, daß am Eingang zum aktiven Zentrum die Guanidinogruppe des Arginins 47 liegt, die im ternären Komplex mit der Pyrophosphat-Gruppe des Coenzym in Wechselwirkung tritt. In Abwesenheit des Coenzym bindet dieser Guanidinrest andere Anionen, z.B. $Pt(CN_4)^{2-}$ sehr fest, wodurch der Zugang zum aktiven Zentrum blockiert ist (57).

Aufgrund dieser Ergebnisse besteht die Möglichkeit, daß diese Guanidinogruppe beim 5- α -Ketobutyrat-NAD statt der Pyrophosphat Gruppe die ebenfalls stark acide Carboxyl-Gruppe des α -Ketobuttersäure-Restes bindet, und damit den Zugang zum aktiven Zentrum der ADH verhindert. Die LDH und MDH besitzen ebenfalls ein Arginin, das über seinen Guanidin-Rest mit der Pyrophosphat-Gruppe des Coenzyms im ternären Komplex in Wechselwirkung steht, doch liegt dieses Arginin im Loop. Da aufgrund der Röntgenstruktur-Ergebnisse gezeigt werden konnte, daß im Apoenzym der Loop weit in das Lösungsmittel ragt, ist das aktive Zentrum der LDH und MDH nicht so abgeschirmt wie bei der ADH.

Doch zurück zur ursprünglichen Frage nach dem Grund der fehlenden Reduzierbarkeit von 5- α -Ketobutyrat-NAD. Nachdem das Redoxpotential als Ursache ausgeschlossen worden ist, zeigt die nichtkompetitive Hemmung der ADH, daß 5- α -Ketobutyrat-NAD nicht im aktiven Zentrum gebunden wird und deshalb auch nicht enzymatisch von der ADH reduziert werden kann.

LDH und MDH binden 5- α -Ketobutyrat-NAD im aktiven Zentrum und wenn trotzdem keine Reduktion bei Zugabe von Lactat bzw. Malat möglich ist, so läßt sich dies nur mit sterischen Gründen erklären. Röntgenstrukturanalysen des ternären LDH-Komplexes haben gezeigt, daß das Substrat sich so über dem Nicotinamidring anordnet, daß das zu übertragende Hydridion direkt über dem C-4-Atom des Nicotinamidringes liegt, während die Hydroxyl-Gruppe des Lactats durch Wasserstoffbrücken-Bindung mit dem Imdidazol-Stickstoff des essentiellen Histidins so polarisiert wird, daß eine Hydridübertragung möglich ist (51). In Abb. 19a ist dies schematisch dargestellt.

Es ist nun leicht einzusehen (Abb. 19b), daß der α -Ketobuttersäure-Rest die Bildung eines ternären Enzym:5- α -Ketobutyrat-NAD:Lactat-Komplexes verhindert, was natürlich den Verlust der Reduzierbarkeit zur Folge hat.

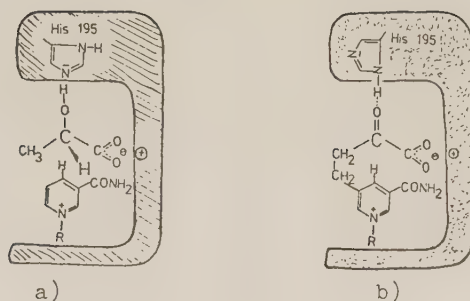


Abb. 19a: Ternärer Komplex aus LDH, NAD, Lactat.

19b: Komplex aus LDH und 5- α -Ketobutyrat-NAD.

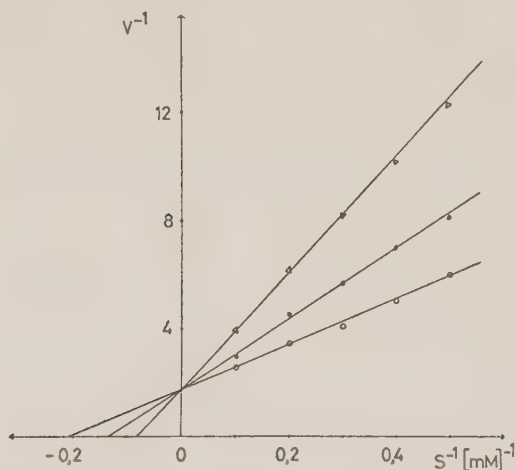


Abb. 20: Hemmung der LDH H_4 durch 5- α -Ketobutyrate-NAD

2 - 10 mM L-Lactat (Na-Salz), 0,25 mM NAD, $1,46 \times 10^{-3}$ mg/ml LDH H_4 (423 U/mg) in 0,1 M Glycin-NaOH-Puffer pH 9,5, bei 25 °C.

○ ohne Inhibitor, ● 1 mM 5- α -Ketobutyrate-NAD,

△ mM 5- α -Ketobutyrate-NAD

Geht man davon aus, daß der α -Ketobuttersäure-Rest den Platz des Lactats im ternären Komplex der LDH einnimmt, sollte die Kinetik in bezug auf Lactat einen kompetitiven Hemmtyp darstellen. Abb. 20 zeigt, daß dies der Fall ist. Der K_I -Wert liegt in der gleichen Größenordnung wie bei der kompetitiven Hemmung gegenüber NAD.

Für 5- α -Ketobutytrat-NAD $K_I = 1,58 \times 10^{-3} \text{ M}$

Für Lactat $K_M = 4,83 \times 10^{-3} \text{ M}$

Da der K_M -Wert des Lactats unter gleichen Bedingungen ohne Hemmstoff $4,83 \times 10^{-3} \text{ M}$ beträgt, ist er größer als der K_I -Wert, d.h. 5- α -Ketobutytrat-NAD wird fester als Lactat gebunden. Dies liegt daran, daß 5- α -Ketobutytrat-NAD, genau wie NAD, mit seinem Adenosin-Rest zusätzliche Wechselwirkungen mit den Aminosäure-Resten der Coenzym-Bindungsstelle eingehen kann (siehe Abb. 1 in Abschnitt 1.o.o.).

3.2.3 Untersuchungen zur Substrataktivität von 5- α -Ketobutytrat-NAD

In Abschnitt 3.1.0. wurde gezeigt, daß 5- α -Ketobutytrat-Nicotinamid als Substrat von der LDH reduziert wird. Da die kinetischen Messungen im vorangegangenen Abschnitt ergaben, daß 5- α -Ketobutytrat-NAD sowohl Coenzym- als auch Substrat Bindungsstelle besetzt und daher nicht coenzymalog reduziert wird, sollte eine substratanaloge Reduktion des α -Ketobuttersäure-Restes auch nicht möglich sein. Wie die Versuche mit LDH und D-LDH zeigen, wird 5- α -Ketobutytrat-NAD in Gegenwart von NADH doch zum 5- α -Hydroxybutytrat-NAD reduziert. Das entstandene 5- α -Hydroxybutytrat-NAD wurde dünnschichtchromatographisch über seinen R_F -Wert identifiziert.

Um die von LDH H_4 katalysierte substratanaloge Reduktion von 5- α -Ketobutytrat-NAD mit der von 5- α -Ketobutytrat-Nicotinamid vergleichen zu können, wurde die Reaktionsgeschwindigkeit in

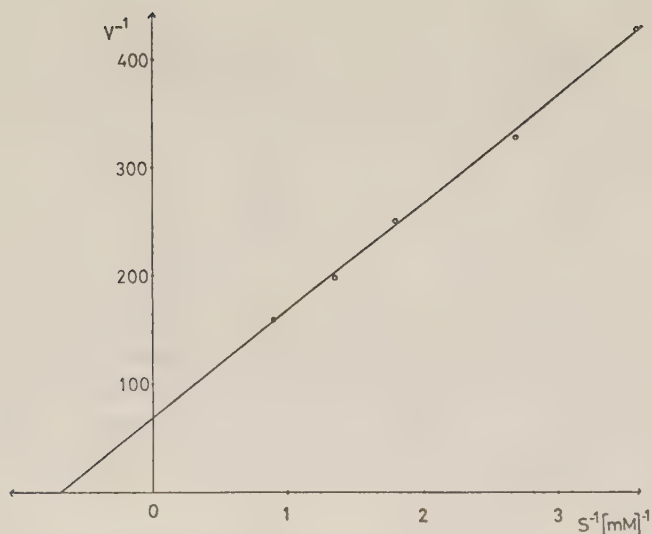


Abb. 21: Kinetische Messungen mit 5- α -Ketobutyrat-NAD als Substrat der LDH-H₄

Es wurde die Extinktionsabnahme bei 366 nm einer NADH-Lösung (0,48 mM) mit verschiedenen 5- α -Ketobutyrat-NAD-Konzentrationen (0,28 - 1,12 mM) in einem 67 mM Phosphat-Puffer pH 7,2 , 25 °C gemessen. Katalysiert wurde die Reaktion von 0,837 mg/ml LDH H₄.

Tab. 8: K_M- und V_{max}-Werte verschiedener Substrate der LDH H₄

	K _M	V _{max} $\left[\frac{\text{Mole (S)}}{\text{Mole (E)} \times \text{min}} \right]$
5- α -Ketobutyrat-Nicotinamid	$7,75 \times 10^{-4} \text{ M}$	2,95
5- α -Ketobutyrat-NAD	$14,30 \times 10^{-4} \text{ M}$	0,185
o-Nitrophenyl-Pyruvat	$1,37 \times 10^{-4} \text{ M}$	6,88
Pyruvat	$0,59 \times 10^{-4} \text{ M}$	15300,0

Abhängigkeit von der Substratkonzentration (5- α -Ketobutyrat-NAD) gemessen. Die Auftragung der Werte nach Lineweaver-Burk ergab die in Abb. 21 dargestellte Gerade. In Tabelle 8 befinden sich die daraus errechneten K_M - und V_{max} -Werte zusammen mit den von 5- α -Ketobutyrat-Nicotinamid, o-Nitrophenylpyruvat und Pyruvat. Diese Zusammenfassung zeigt, daß sich die K_M -Werte nur langsam mit zunehmender Größe des Restes am C-3-Atom der α -Ketosäure ändern, was darauf hinweist, daß für die substratanaloge Bindung an das Enzym der α -Ketosäure-Teil maßgebend ist.

Die Umsatzgeschwindigkeit ändert sich dagegen wesentlich stärker.

Die Differenz zwischen dem V_{max} -Wert von Pyruvat und 5- α -Ketobutyrat-Nicotinamid beträgt 5000. 5- α -Ketobutyrat-NAD wird aufgrund des großen NAD-Restes noch um eine weitere Zehnerpotenz langsamer als 5- α -Ketobutyrat-Nicotinamid umgesetzt.

Erklären läßt sich die substratanaloge Umsetzung von 5- α -Ketobutyrat-NAD dadurch, daß das wesentlich fester bindende NADH (K_D von NADH ist um den Faktor 300 kleiner als K_D von NAD) den NAD-Teil des 5- α -Ketobutyrat-NAD's leicht verdrängen kann, so daß ein ternärer Komplex aus LDH:NADH:5- α -Ketobutyrat-NAD entsteht, bei dem der NAD-Teil außerhalb des aktiven Zentrums liegt.

Eine andere Dehydrogenase, die auch Pyruvat reduziert, ist die L-Alanin-DH. Hierbei entsteht in Gegenwart von Ammonium-Ionen statt der Milchsäure das Alanin.



Die Alanin-DH reduziert im Gegensatz zur LDH den α -Ketobuttersäure-Rest von 5- α -Ketobutyrat-NAD nicht. Dies ist um so erstaunlicher, da wie später gezeigt wird, eine intramolekulare Hydridübertragung bei 5- α -Ketobutyrat-NADH von der Alanin-DH katalysiert wird.

3.3.0. Biochemische Eigenschaften von 5- α -Ketobutyrat-NADH

Durch chemische Reduktion des Nicotinamidrings von 5- α -Ketobutyrat-NAD erhält man das 5- α -Ketobutyrat-NADH. Bei dieser Verbindung handelt es sich um ein "wirkliches" Coenzym-Substrat-Modell, denn das oxydierte Substrat Pyruvat ist über eine Methylen-Brücke kovalent an das reduzierte Coenzym-NADH gebunden. Die Untersuchungen zur biochemischen Eigenschaft von 5- α -Ketobutyrat-NADH befaßten sich daher in erster Linie mit der Frage der intramolekularen Hydridübertragung durch die LDH.

Auch bei der Alanin-Dehydrogenase (Alanin-DH) erschien theoretisch eine intramolekulare Redoxreaktion in Gegenwart von Ammonium-Ionen möglich. Der Vollständigkeit halber wurde aber auch untersucht, ob bei anderen Dehydrogenasen, die ein pyruvat-ähnliches Substrat mit NADH als Coenzym reduzieren, eine intramolekulare Hydridübertragung möglich ist und falls nicht, ob der NADH-Teil coenzymanalogue oxydiert wird.

3.3.1. Hydridübertragung katalysiert durch die LDH

Die kinetischen Messungen in Abschnitt 3.2.2. mit 5- α -Ketobutyrat-NAD ergaben, daß diese Verbindung sowohl an die Coenzym- als auch an die Substrat-Bindungsstelle der L-LDH gebunden wird. Dieses Ergebnis macht es wahrscheinlich, daß beim 5- α -Ketobutyrat-NADH eine Hydridübertragung stattfinden kann.

Der Versuch bestätigte die Vermutung. Gibt man zu einer 0,4 mM 5- α -Ketobutyrat-NADH-Lösung (dies entspricht der NADH-Konzentration des Aktivitäts-Testes) die 2000fache LDH-Menge bezogen auf die Enzymmenge im Aktivitäts-Test, so verschwindet das Absorptionsmaximum im langwelligen Bereich bei 342 nm, was auf die Oxydation des Dihydropyridinringes zurückzuführen ist. Außerdem addiert das entstandene Produkt Cyanid-Ionen und gibt eine positive Reaktion im Test auf quartäre Pyridinium-Verbindungen mit Butanon-(2)/NH₃ (siehe Material und Methoden 6.7.0.).

All dies bestätigt die Oxydation des Dihydropyridinringes im 5- α -Ketobutyrat-NADH.

Als nächstes galt es zu beweisen, daß mit der Oxydation des NADH-Teils die Reduktion der Carbonylgruppe des α -Ketobuttersäure-Restes verknüpft ist. Deshalb wurde nach Beendigung der Extinktionsabnahme das entstandene NAD-Derivat aus dem Reaktionsansatz säulenchromatographisch isoliert und gereinigt (siehe Abschnitt 5.6.2.) und anschließend dünnschichtchromatographisch mit dem synthetisierten 5- α -Hydroxybutyrat-NAD verglichen. Beide Verbindungen verhielten sich sowohl säulenchromatographisch als auch dünnschichtchromatographisch in verschiedenen Laufmitteln (LM:A, B und C; Abschnitt 6.5.0.) identisch. Auch nach der enzymatischen Hydrolyse des enzymatisch hergestellten NAD-Derivates mit der NAD-Glycohydrolase zeigte sich bei der anschließenden Dünnschichtchromatographie, daß neben ADPR eine zweite Substanz entstanden war, die den gleichen R_F -Wert wie 5- α -Hydroxybutyrat-Nicotinamid hat. Damit ist eindeutig geklärt, daß durch enzymatische Katalyse von LDH eine Hydridübertragung stattfindet, wobei 5- α -Hydroxybutyrat-NAD entsteht.

Die Hydridübertragung verläuft bei den natürlichen Substraten der LDH stereospezifisch, denn es wird das Hydridion der A-Seite des Dihydropyridinringes (nach der absoluten Konformation ist es die R-Form (53, 54)) so auf das Pyruvat übertragen, daß bei der Katalyse der LDH die L-Milchsäure entsteht. Der Beweis für die Übertragung des A-Hydridions läßt sich mit 5- α -Ketobutyrat-NADH nicht ohne weiteres durchführen. Hierzu müßte man 5- α -Ketobutyrat-NADD mit eindeutiger Konfiguration des Deuteriums am C-4-Atom des Nicotinamids herstellen, was aufgrund der fehlenden Coenzymaktivität des NAD-Derivates nicht möglich ist. Dagegen ist die Bestimmung der Konfiguration der Hydroxylgruppe des α -Hydroxybuttersäure-Restes enzymatisch möglich. In Abschnitt 3.1.0. wurde gezeigt, daß das racemische Gemisch von 5- α -Hydroxybutyrat-Nicotinamid von der LDH in

Gegenwart von NAD enzymatisch oxydiert wird. Aus diesem Grund wurde das durch Katalyse der LDH erhaltene 5- α -Hydroxybutyrat-NAD mit der NAD-Glycohydrolyse wieder in 5- α -Hydroxybutyrat-Nicotinamid und ADPR gespalten. Durch säulenchromatische Abtrennung des ADPR's erhält man optisch aktives 5- α -Hydroxybutyrat-Nicotinamid, das mit LDH in Gegenwart von NAD oxydiert wurde. Macht man dagegen den gleichen Versuch mit der D-LDH, so findet keine Oxydation statt. Aus diesem stereospezifischen Verhalten zeigt sich, daß das entstandene 5- α -Hydroxybutyrat-NAD einen (L)- α -Hydroxybuttersäure-Rest besitzt, und die Hydridübertragung damit stereospezifisch abläuft.

3.3.2. Kinetische Untersuchungen der Hydridübertragung katalysiert durch die LDH

Nachdem bewiesen worden ist, daß durch die katalytische Wirkung der LDH das optisch aktive 5- α -(L-Hydroxybutyrat)-NAD entsteht, sollen nun in diesem Abschnitt kinetische Messungen beschrieben werden.

Im Mittelpunkt steht dabei die Frage, ob es sich bei der Hydridübertragung um eine intra- oder intermolekulare Reaktion handelt. Zwei Beobachtungen beweisen eine intramolekulare Hydridübertragung:

- 1.) Wie in Abschnitt 3.2.0. gezeigt wurde, ist die Bildung eines ternären Komplexes aus LDH:5- α -Ketobut.-NAD:Lactat nicht möglich, weil der Platz des Substrats durch den α -Ketobuttersäure-Rest vom 5- α -Ketobutyryl-NAD blockiert ist. Bei einer intermolekularen Reduktion zwischen zwei 5- α -Ketobutyryl-NADH-Molekülen müßte sich der α -Ketobuttersäure-Rest des einen Moleküls in die unmittelbare Nähe des C-4-Atoms des Dihydropyridinringes von dem zweiten Molekül 5- α -Ketobutyryl-NADH anlagern, was aber auf die gleichen Schwierigkeiten stoßen sollte, wie sie im Abschnitt 3.2.0.

für die Bildung des ternären LDH:5- α -Ketobut.-NAD:Lactat-Komplexes gezeigt wurden.

- 2.) Außerdem wurde die Geschwindigkeit der Hydridübertragung in Abhängigkeit von steigenden Mengen an Pyruvat gemessen. Im Falle einer intermolekularen Hydridübertragung sollte Pyruvat erfolgreich mit dem als Substrat fungierenden 5- α -Ketobutytrat-NADH-Molekül konkurrieren, und eine schnellere Reaktionsgeschwindigkeit bewirken. Aber selbst bei einer 5 mM Pyruvatkonzentration im Testansatz änderte sich die Reaktionsgeschwindigkeit nicht.

Beide Isoenzyme der LDH aus Schweineherz und Schweinemuskel katalysieren die Hydridübertragung, dabei ist die maximale Umsatzgeschwindigkeit mit der LDH M_4 etwas langsamer als mit der LDH H_4 , doch liegen die Werte bei beiden Isoenzymen in der gleichen Größenordnung:

$$\text{LDH } M_4: V_{\max} = 2,67 \left[\frac{\text{Mole (S)}}{\text{Mole (E)} \times \text{min}} \right]$$

$$\text{LDH } H_4: V_{\max} = 5,13 \left[\frac{\text{Mole (S)}}{\text{Mole (E)} \times \text{min}} \right]$$

Wie schon erwähnt, hemmt Pyruvat die Geschwindigkeit der Umsetzung von 5- α -Ketobutytrat-NADH mit der LDH H_4 nicht. Für die LDH M_4 gilt das gleiche. Im Gegensatz dazu tritt in Anwesenheit von NADH bei beiden Isoenzymen eine Hemmung auf. Befindet sich im Testansatz die doppelte molare Menge NADH bezogen auf die 5- α -Ketobutytrat-NADH-Konzentration = 0,44 mM, so beträgt die Restaktivität der von LDH M_4 katalysierten Reaktion 82 % und die der LDH H_4 84 %, d.h. die Hemmwirkung von NADH ist bei beiden Isoenzymen gleich groß. Insgesamt betrachtet zeigen die Ergebnisse, daß beide Isoenzyme der LDH die gleichen Eigenschaften in bezug auf ihr Verhalten gegenüber 5- α -Ketobutytrat-NADH haben.

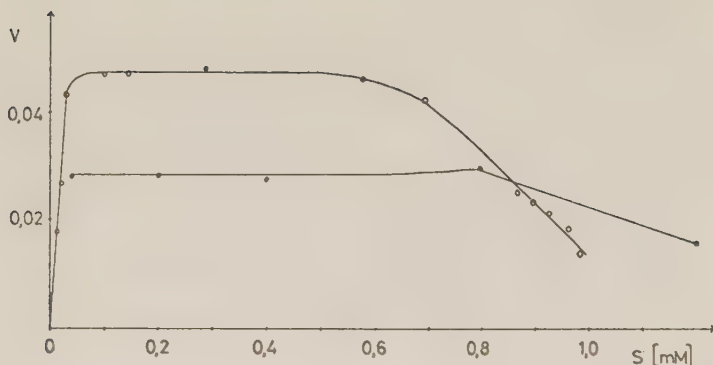


Abb. 22: Reaktionsgeschwindigkeit der Hydridübertragung in Abhängigkeit von der 5- α -Ketobutyrat-NADH-Konzentration

Es wurde die Extinktionsänderung bei 366 nm von verschiedenen 5- α -Ketobutyrat-NADH-Konzentrationen (0,01 - 1,2 mM) in 67 mM Phosphat-Puffer pH 7,2, 25 °C gemessen.

- katalysiert von 0,785 mg/ml LDH H₄
- katalysiert von 0,946 mg/ml LDH M₄

Als nächstes wurde die Reaktionsgeschwindigkeit der Hydridübertragung in Abhängigkeit von der 5- α -Ketobutyrat-NADH-Konzentration betrachtet. In Abbildung 22 sind sowohl für die LDH H₄ als auch LDH M₄ die Anfangsgeschwindigkeiten gegen die dazugehörigen Substratkonzentrationen aufgetragen. Schon bei einer 0,05 mM 5- α -Ketobutyrat-NADH-Konzentration ist die maximale Geschwindigkeit der Umsetzung sowohl bei LDH H₄ als auch bei LDH M₄ erreicht. Erhöht man die Konzentration über 0,6 mM 5- α -Ketobutyrat-NADH hinaus, so verlangsamt sich die Geschwindigkeit bei der von der LDH H₄ katalysierten Reaktion. Bei

der LDH M_4 tritt die Hemmung erst bei einer etwas höheren Konzentration (1mM) auf.

Eine Erklärung dieser Hemmung ist schwierig. Da das eingesetzte 5- α -Ketobutyrat-NADH dünnstschichtchromatographisch in verschiedenen Laufmitteln keine Verunreinigung aufweist, ist die Hemmung nur so zu erklären, daß neben der enzymatisch aktiven β -Konformation der N-glycosidischen Bindung zwischen Ribose und dem Dihydropyridinring ein gewisser Anteil zum α -Isomeren umgewandelt worden ist. Von dem α -NADH weiß man aber, daß es als Hemmstoff bei der LDH, MDH und ADH wirkt (58). Für eine Isomerisierung spricht auch die Beobachtung, daß 5- α -Ketobutyrat-NADH nicht vollständig zum 5- α -Hydroxybutyrat-NAD umgesetzt wird. Annähernd 25 % der eingesetzten 5- α -Keto-butyrat-NADH-Menge liegt, nachdem keine Extinktionsänderung mehr stattfindet, noch als 5- α -Ketobutyrat-NADH vor.

Es stellt sich damit die Frage, wie es zu der Entstehung der α -Form kommt. Die NAD-Glycohydrolase ist ein stereospezifisches Enzym, das nur aus β -NAD das entsprechende β -NAD-Derivat herstellt (59). Somit kann man davon ausgehen, daß 5- α -Ketobutyrat-NAD in der β -Konformation vorliegt. Dagegen ist bekannt, daß beim NADH im neutralen und vor allem im sauren Medium sich ein Gleichgewicht einstellt zwischen der α - und β -Konformation des NADH's. Oppenheimer und Kaplan (60, 61) beschrieben, daß unter physiologischen Bedingungen (pH 7,5, 35 °C) dieses Gleichgewicht zu 90 % aus β -NADH und 10 % α -NADH besteht. Für die Isomerisierung wurde der folgende Mechanismus postuliert:

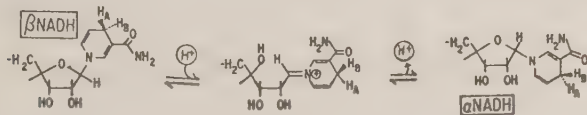


Abb. 23: Isomerisierungs-Reaktion des NADH's im Sauren

Woenkhaus (62) beobachtete, daß bei der chemischen Reduktion von α -NAD bis zu 25 % β -NADH entsteht. Da 5- α -Ketobutyrat-NADH durch chemische Reduktion hergestellt wurde und anschließend mit LiCl pH 7,2 gereinigt worden ist, kann man eine Isomerisierung nicht ausschließen. Bestätigt wurde diese Isomerisierung durch Vergleich mit NADH, das unter gleichen Bedingungen durch chemische Reduktion aus β -NAD hergestellt und säulenchromatographisch gereinigt worden ist. Die Umsetzung mit LDH zeigte, daß nach Beendigung der Extinktionsabnahme eine Restabsorption von 17,6 % blieb. Danach ist zu erwarten, daß auch 5- α -Ketobutyrat-NADH isomerisiert, wodurch die Unvollständigkeit der Hydridübertragung und gleichzeitig die Hemmung der Hydridübertragung bei hohen Konzentrationen an 5- α -Ketobutyrat-NADH erklärbar ist.

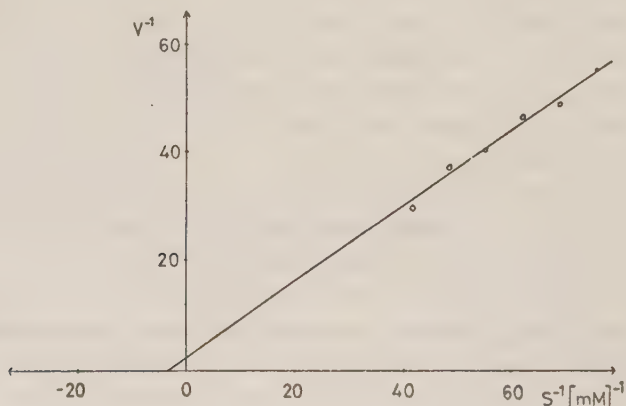


Abb. 24: Kinetische Messung der intramolekularen Hydridübertragung katalysiert von der LDH H_4

Es wurde die Extinktionsabnahme bei 366 nm von verschiedenen 5- α -Ketobutyrat-NADH-Konzentrationen (0,013 - 0,029 mM) in 67 mM Phosphat-Puffer pH 7,2, 25 °C gemessen. Katalysiert wurde die Reaktion von 0,785 mg/ml LDH H_4 .

Mit der LDH H_4 wurde K_M und $V_{\max}$ der intramolekularen Hydridübertragung bei 5- α -Ketobutyrat-NADH bestimmt, indem nach Lineweaver-Burk die reziproken Anfangsgeschwindigkeiten gegen die dazugehörigen reziproken Substrat-Konzentrationen aufgetragen wurden (Abb. 24). In Tabelle 9 sind die gemessenen K_M und $V_{\max}$ -Werte von 5- α -Ketobutyrat-NADH zusammen mit denen unter gleichen Bedingungen (pH 7,2; 25 °C) erhaltenen Werte von Pyruvat und NADH eingetragen.

Tab. 9: K_M - und $V_{\max}$ -Werte der Hydridübertragung katalysiert von der LDH H_4

	K_M	$V_{\max}$ $\left[\frac{\text{Mole (S)}}{\text{Mole (E) x min}} \right]$
5- α -Ketobutyrat-NADH	$2,94 \times 10^{-4} \text{ M}$	5,73
NADH	$0,21 \times 10^{-4} \text{ M}$	17040
Pyruvat	$0,59 \times 10^{-4} \text{ M}$	

Der Vergleich der K_M -Werte zeigt, daß die Affinität von der LDH H_4 zu 5- α -Ketobutyrat-NADH sich nicht stark von der zu den natürlichen Substraten (Pyruvat und NADH) unterscheidet. Bei der maximalen Umsatzgeschwindigkeit sieht es dagegen anders aus. 5- α -Ketobutyrat-NADH wird um den Faktor 3000 langsamer umgesetzt als die natürlichen Substrate. Erklären läßt sich die langsamere intramolekulare Hydridübertragung durch die kovalente Bindung des Substrat-Teils. Der α -Ketobuttersäure-Rest ist dadurch nicht so beweglich wie das freie Pyruvat, so daß die Wahrscheinlichkeit, daß der α -Ketobuttersäure-Rest die gleiche günstige Lage wie das Pyruvat einnimmt, recht gering ist. Hinzu kommt, daß sich die zusätzliche Methylengruppe störend auswirken wird. Vergleicht man die $V_{\max}$ -Werte von 5- α -Ketobutyrat-Nicotinamid, o-Nitrophenylpyruvat und 5- α -Ketobutyrat-NADH, so fällt der annähernd gleich langsame Um-

satz auf, während die K_M -Werte dieser Verbindungen in allen Fällen bei 10^{-4} M liegen. Substratanaloge Verbindungen, die am C-3-Atom des Pyruvats einen kleineren Rest tragen, wie z.B. eine Hydroxyl- oder Methyl-Gruppe (63, 64), werden dagegen fast gleich schnell wie Pyruvat umgesetzt. Eine Erklärung für den langsameren Umsatz ist folgendermaßen möglich:

Röntgenstrukturanalytische Untersuchungen von Rossmann an der Dogfish LDH M_4 (8, 9) zeigten, daß die LDH einen aus den Aminosäuren 98 - 120 bestehenden Loop besitzt, der im Apoenzym weit aus dem Proteinverband in das Lösungsmittel hineinragt, im ternären Komplex sich aber um 11 Å dem aktiven Zentrum nähert und es zum Lösungsmittel hin abdeckt. Durch diese starke Konformationsänderung, die mit weiteren vergleichsweise geringen Konformationsänderungen im gesamten LDH-Molekül parallel läuft, wird das aktive Zentrum von Wasser abgeschirmt. Gleichzeitig bilden sich neue Wechselwirkungen zwischen Coenzym und Substrat einerseits und den Aminosäure-Resten des Loops andererseits aus. Besonders wichtig erscheint die Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Guanidino-Gruppe des Arginins 101 und der Pyrophosphat-Gruppe des Coenzym zu sein, denn damit verbunden ist eine leichte Konformationsänderung des Coenzym. Das Coenzym, das schon im binären Komplex in einer gestreckten Form gebunden ist, wird durch die Wasserstoffbrückenbindung mit dem Arginin 101 noch stärker in die gestreckte Konformation gebracht, wodurch der Nicotinamidring im ternären Komplex näher an die Substrat-Bindungsstelle und an das essentielle Histidin 195 herangeführt wird. In Abb. 1 der Einleitung sind die Wechselwirkungen zwischen LDH, Coenzym und Substrat im ternären Komplex abgebildet.

An einem nach Röntgenstrukturdaten hergestellten Modell der LDH (74) sieht man, daß, wenn 5- α -Ketobutyrat-Nicotinamid oder o-Nitrophenylpyruvat als Substrat von der LDH gebunden werden, der recht große Rest am C-3- bzw. C-4-Atom eine Konformationsänderung des Loops um 11 Å behindert. Paßt man 5- α -Ketobutyrat-NADH in das Modell der LDH ein, so zeigt sich, daß

auch die zusätzliche CH_2 -Gruppe, die Coenzym und Substrat verbindet, zum Loop hin zeigt und somit im ternären Komplex die vollständige Konformationsänderung des Loops beeinträchtigen muß.

Bei dem von Kaplan et.al. (21) hergestellten 5-Methyl-NAD stört die CH_3 -Gruppe die Konformation der LDH so stark, daß die enzymatische Reduktion des 5-Methyl-NAD's nicht möglich ist. Das gleiche gilt auch für 5-Carboxy-NADH. Fluoreszenzmessungen mit 5-Carboxyl-NADH in Abschnitt 3.5.1. zeigen, daß der binäre Komplex mit der LDH sich bildet, der ternäre Komplex aber nicht.

Für o-Nitrophenylpyruvat konnten Holbrook et.al. (40,65) zeigen, daß zwischen zwei ternären Komplexen zu unterscheiden ist. Die Bildung des ersten ternären Komplexes verläuft schnell und ist von der Protonierung des Histidins 195 abhängig. Dieser Komplex isomerisiert zum aktiven ternären Komplex, aus dem heraus die Hydridübertragung stattfindet. Diese Isomerisierung ist bei o-Nitrophenylpyruvat als Substrat sehr langsam im Vergleich zur Isomerisierung des ternären Komplexes mit Pyruvat. In Abb. 25 ist der von Holbrook aufgestellte Mechanismus wiedergegeben.

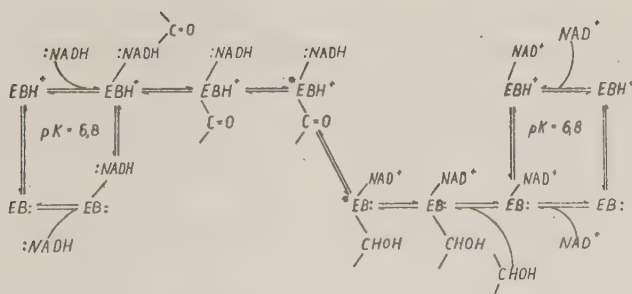


Abb. 25: Mechanismus der Katalyse der LDH

Es wäre interessant zu sehen, ob die von mir untersuchten Verbindungen auch eine langsamere Bildung des aktivierten Komplexes bewirken. Vor allem drängt sich die Frage auf, welch

Konformationsänderungen beim Übergang vom ersten zum zweiten, aktiven ternären Komplex stattfinden und wie weit das Coenzym-Substrat-Modell die Konformationsänderung behindert. Im Rahmen dieser Arbeit war es aber nicht möglich, diesen Fragen nachzugehen, denn im Mittelpunkt standen die Untersuchungen der biochemischen Eigenschaften der synthetisierten NAD- und NADH-Derivate gegenüber LDH und anderen Dehydrogenasen.

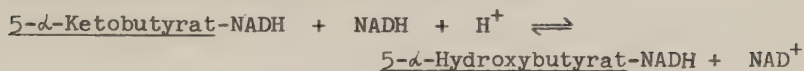
3.3.3. Substratanaloge Reduktion von 5- α -Ketobutyrat-NADH katalysiert von der D-LDH

Einige niedrige Tierarten und eine Reihe von Mikroorganismen besitzen eine D-LDH. Dieses Enzym oxydiert nur D-Lactat bzw. reduziert Pyruvat spezifisch zum D-Lactat. Die D-LDH ist aus mehreren Organismen isoliert und charakterisiert worden (66, 67), doch so gut untersucht wie die LDH ist dieses Enzym nicht.

In Abschnitt 3.2.1. ist gezeigt worden, daß die D-LDH sich gegenüber 5- α -Ketobutyrat-NAD genauso verhält wie die LDH, d.h. nur der α -Ketobuttersäure-Rest wird substratanalog in Gegenwart von NADH reduziert. Untersuchungen mit 5- α -Ketobutyrat-NADH ergaben, daß die D-LDH eine intramolekulare Hydridübertragung nicht katalysiert. Die Versuche wurden, wie schon im vorigen Abschnitt mit der LDH beschrieben, mit einem großen Enzymüberschuß und 5- α -Ketobutyrat-NADH-Konzentrationen bis zu 2 mM durchgeführt.

Aufgrund dieses Ergebnisses stellte sich die Frage, ob der NADH-Teil in Gegenwart von Pyruvat oxydiert und / oder der α -Ketobuttersäure-Rest in Gegenwart von NADH reduziert wird. Trotz hoher Enzym- und 5- α -Ketobutyrat-NADH-Konzentrationen reagierte 5- α -Ketobutyrat-NADH wie auch schon 5- α -Ketobutyrat-NAD nicht als Coenzym. Der α -Ketobuttersäure-Rest wird dagegen von der D-LDH substratanalog reduziert.

Substratanaloge Reaktion der D-LDH:



Diese Ergebnisse zu diskutieren ist sehr schwer, da bislang über den Mechanismus der stereospezifischen Katalyse der D-LDH sowie über den Aufbau des aktiven Zentrums kaum Daten vorliegen. Bekannt ist, daß das A-Hydridion des Dihydropyridinringes vom NADH auf das Pyruvat übertragen wird (68). Daraus wurde gefolgert, daß das Coenzym in der D-LDH die gleiche räumliche Anordnung wie in der LDH hat. Da das Hydridion auf die entgegengesetzte Seite am Carbonyl-C-Atom des Pyruvats angelagert werden muß, läßt sich dies nur mit einem Unterschied in der Substrat-Bindungsstelle der D-LDH erklären. Dennis und Kaplan (70) stellten ein Modell auf, nach dem das Substrat in der D-LDH so gedreht ist, daß die CH_3 -Gruppe im Inneren des Enzyms liegt, während die Carboxyl-Gruppe weiter zur Oberfläche des Enzyms zeigt. Schematisch dargestellt ergibt sich das folgende Bild des ternären Komplexes der D-LDH (Abb. 26).

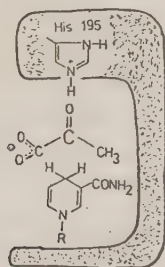


Abb. 26: Ternärer Komplex der D-LDH nach Kaplan (70)

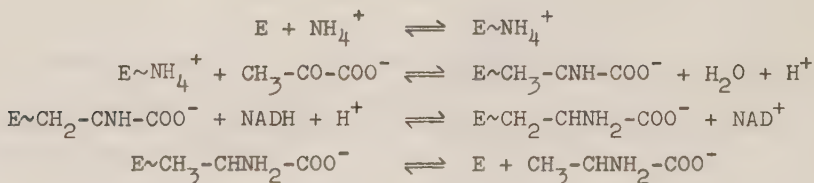
Als Bestätigung für dieses Modell führten sie die stereospezifische Übertragung des A-Hydridions vom Coenzym und die fehlende Hemmbarkeit der untersuchten D-LDH durch Oxamat an. Neuere Arbeiten mit D-LDH aus *E. coli* (69) berichten dagegen von einer Hemmung der D-LDH durch Oxamat, was gegen das Modell von Kaplan spricht. Auch meine Ergebnisse widerlegen die

These, daß Pyruvat über die Methyl-Gruppe von der D-LDH gebunden wird. Die substratanaloge Reduktion des α -Ketobuttersäure-Restes ist nur dann möglich, wenn der große NADH-Rest außerhalb des aktiven Zentrums liegt.

Daß im ternären Komplex der LDH, verglichen mit dem ternären Komplex der D-LDH die relative Stellung von Coenzym und Substrat zueinander verändert sein muß, ergibt sich aus der intramolekularen Hydridübertragung, die von der LDH katalysiert wird, in Gegenwart der D-LDH aber nicht abläuft. Dies beweist aber gleichzeitig, daß 5- α -Ketobutyryl-NADH ein recht gutes Bild der räumlichen Anordnung von NADH und Pyruvat im aktiven Zentrum der LDH widerspiegelt.

3.3.4. Hydridübertragung katalysiert durch L-Alanin-DH

Die L-Alanin-DH ist bislang nur in Bakterien gefunden worden (71, 72). Sie katalysiert die reduktive Aminierung des Pyruvats. Goldman (73) legte der Reaktion den folgenden Mechanismus zugrunde:



Dieser Mechanismus stimmt mit der Beobachtung überein, daß keine freie Iminosäure auftritt.

Da L-Alanin-DH Pyruvat und NADH bei der Katalyse bindet, besteht die Möglichkeit, daß das Coenzym-Substrat-Modell der L-LDH auch von der L-Alanin-DH akzeptiert wird und eine Hydridübertragung stattfindet. Um dies zu untersuchen, wurde zu einer Testmischung aus 0,4 mM 5- α -Ketobutyryl-NADH und 0,15 M NH_4^+Cl 0,06 mg L-Alanin-DH gegeben. Beobachtet man die Absorption

bei 366 nm im Eppendorf-Photometer, so sieht man eine Abnahme der Extinktion, die auf die Oxydation des NADH-Teils zurückzuführen ist. Die Oxydation wurde auch durch die nucleophile Addition von Cyanid-Ionen an den Nicotinamidring des entstandenen NAD-Derivats bestätigt. Außerdem zeigte die Verbindung eine positive Reaktion im Test auf quartäre Pyridinium-Verbindungen mit Butanon-(2)/NH₃.

Daaßer 5- α -Ketobutyrat-NADH bei der von L-Alanin-DH katalysierten Hydridübertragung kein weiteres Substrat anwesend ist, muß das Hydridion vom Dihydropyridin-Ring auf den Substratrest des 5- α -Ketobutyrat-NADH's übertragen worden sein. Gleichzeitig wurde aber auch festgestellt, daß die Hydridübertragung nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von NH₄⁺-Ionen abläuft. Daher sollte durch die Katalyse der L-Alanin-DH das entstandene NAD-Derivat nicht einen α -Hydroxybuttersäure-Rest sondern einen α -Aminobuttersäure-Rest besitzen. Dies wurde durch die spezifische Nachweismethode auf primäre Amine mit Ninhydrin bestätigt. Für diesen Nachweis wurde das bei der Hydridübertragung entstandene NAD-Derivat säulenchromatographisch gereinigt und isoliert. Die Anfärbung mit Ninhydrin läßt sich aber an dem NAD-Derivat selbst noch nicht durchführen, da auch das Adenin eine primäre Aminogruppe trägt. Deshalb mußte das NAD-Derivat mit der NAD-Glycohydrolase enzymatisch gespalten werden. Nach Abtrennung des Proteins wurde das Reaktionsgemisch dünn-schichtchromatographisch untersucht. (LM: D, siehe Abschnitt 5.7.0.). Es waren zwei Substanzen zu erkennen, die beide eine negative Reaktion im Test auf Pyridinium-Verbindungen zeigten, d.h. es mußte sich um die beiden Spaltprodukte des NAD-Derivats handeln. Ein Spaltprodukt wurde als ADPR durch Vergleich mit käuflichem ADPR identifiziert. Beide Spaltprodukte färbten sich mit Ninhydrin nach Erhitzen auf 110°C violett. Dadurch ist bestätigt, daß auch das zweite Spaltprodukt (es muß sich aufgrund der Spaltung mit der NAD-Glycohydrolase um den Nicotinamidteil des NAD-Derivats handeln) eine primäre

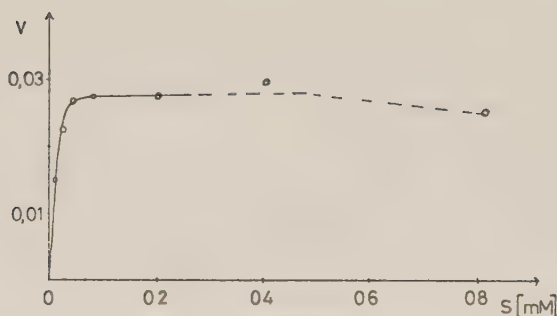


Abb. 27: Reaktionsgeschw. der Hydridübertragung in Abhängigkeit von der 5- α -Ketobutyrat-NADH-Konzentration

Es wurde die Extinktionsänderung bei 366 nm von verschiedenen 5- α -Ketobutyrat-NADH-Konzentrationen (0,02 - 0,81 mM) in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0, 25°C gemessen. Katalysiert wurde die Reaktion von 0,059 mg/ml Alanin-DH.

Aminogruppe enthält. Die von L-Alanin-DH katalysierte Hydridübertragung läßt sich somit folgendermaßen formulieren:



Untersuchungen der Reaktionsgeschwindigkeit sind in Abb. 27 dargestellt. Bereits bei einer 0,05 mM 5- α -Ketobutyrat-NADH-Konzentration ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht. Wie bei der LDH tritt bei Konzentrationen über 0,8 mM 5- α -Ketobutyrat-NADH eine Hemmung auf, die ebenfalls durch den bei der Isomerisierung entstandenen α -Anteil zu erklären ist. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird durch die Anwesenheit von

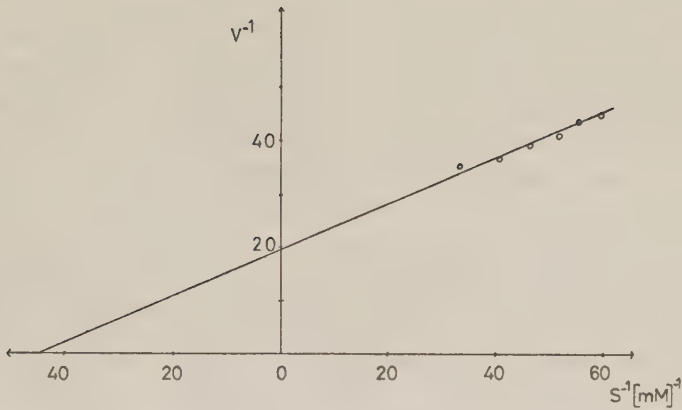


Abb. 28: Kinetische Messungen der intramolekularen Hydrid-
übertragung katalysiert von der L-Alanin-DH

Es wurde die Extinktionsabnahme bei 366 nm von ver-
schiedenen 5- α -Ketobutyrat-NADH-Konzentrationen
(0,03 - 0,017 mM) in 50 mM Tris-HCl-Puffer pH 8,0,
25°C gemessen. Katalysiert wurde die Reaktion von
0,059 mg/ml L-Alanin-DH.

Tab. 10: K_M - und V_{max} -Werte der Hydridübertragung katalysiert
von der L-Alanin-DH

	K_M	$V_{max} \left[\frac{\text{Mole(S)}}{\text{Mole(E)} \times \text{min}} \right]$
5- α -Ketobutyrat- NADH	$2,25 \times 10^{-5} \text{ M}$	9,92
NADH	$2,30 \times 10^{-5} \text{ M}$	14200
Pyruvat	$5,40 \times 10^{-5} \text{ M}$	

Pyruvat oder NADH gehemmt. Gibt man NADH in gleichen Mengen wie 5- α -Ketobutytrat-NADH in den Testansatz, so beträgt die Restaktivität nur noch 25 % bezogen auf die Reaktionsgeschwindigkeit ohne NADH. Pyruvat hemmt die Hydridübertragung weniger. Erst bei der 20fachen Menge Pyruvat bezogen auf die 5- α -Ketobutytrat-NADH-Konzentration, verringert sich die Reaktionsgeschwindigkeit auf 66 %. Die Hemmung durch Pyruvat und NADH zeigt, daß es sich bei der Hydridübertragung um eine intramolekulare Reaktion handeln muß, denn eine intermolekulare Hydridübertragung sollte, wie schon für die LDH diskutiert, sowohl durch NADH als auch durch Pyruvat beschleunigt werden.

Zur Ermittlung von K_M und V_{max} wurden die reziproken Anfangsgeschwindigkeiten gegen die dazugehörigen reziproken 5- α -Ketobutytrat-NADH-Konzentrationen aufgetragen. Abbildung 28 zeigt den Verlauf der Geraden, aus der sich K_M und V_{max} berechnen läßt. Die Werte sind in Tabelle 10 eingetragen zusammen mit den K_M - und V_{max} -Werten von NADH und Pyruvat. Der Vergleich zeigt, daß 5- α -Ketobutytrat-NADH den gleichen K_M -Wert hat wie NADH und damit die gleiche Affinität zur L-Alanin-DH besitzt. Die maximalen Geschwindigkeiten unterscheiden sich dagegen sehr stark. Wie schon bei der LDH muß man auch bei der Alanin-DH eine Störung der Enzymkonformation durch die kovalente Bindung des Substrats und die zusätzliche Methylen-Gruppe als Ursache für den langsamen Umsatz verantwortlich machen.

Bislang liegen noch keine röntgenstrukturanalytischen Daten über den Aufbau des aktiven Zentrums der L-Alanin-DH vor, so daß eine Diskussion über die Art der Behinderung nicht möglich ist. Die intramolekulare Hydridübertragung bei dem Coenzym-Substrat-Modell zeigt ein erstes Bild der Anordnung von Coenzym und Substrat im ternären Komplex der L-Alanin-DH. In Analogie zur LDH ist der ternäre Komplex der L-Alanin-DH in Abbildung 29 dargestellt.

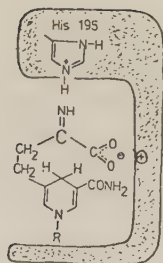


Abb. 29: Schematische Darstellung des L-Alanin-DH:5- α -Iminobutyrat-NADH-Komplexes

Eine andere Anordnung von Substrat und Coenzym-Teil ist aufgrund der kovalenten Bindung beider Teile und aufgrund der erforderlichen räumlichen Nähe zwischen C-4 des Dihydropyridinringes und dem Carbonyl-C-Atom bei diesem Coenzym-Substrat-Modell nicht möglich.

3.3.5. Biochemische Eigenschaften von 5- α -Ketobutyrat-NADH gegenüber Dehydrogenasen, die pyruvat-ähnliche Substrate reduzieren

Neben den bereits besprochenen Dehydrogenasen sind noch eine Reihe von Dehydrogenasen bekannt, die pyruvat-ähnliche Substrate reduzieren. Hierzu zählen die MDH und D-Glycerat-DH.

Die MDH katalysiert die folgende Reaktion:



Oxalacetat unterscheidet sich vom Pyruvat durch eine zusätzliche Carboxylgruppe am C-3-Atom des Pyruvats. Der für die Katalyse wichtige Teil des Substrats, die α -Ketosäure-Gruppe ist die gleiche wie beim Pyruvat. Deshalb scheint eine intramolekulare Hydridübertragung katalysiert durch die MDH nicht ausgeschlossen. Der Versuch zeigte aber, daß die MDH eine derartige Hydridübertragung nicht katalysiert. Auch konnte keine coenzymanaloge Oxydation des NADH-Teils in Anwesenheit von Oxalacetat beobachtet werden. Dagegen wirkt 5- α -Ketobutyrat-

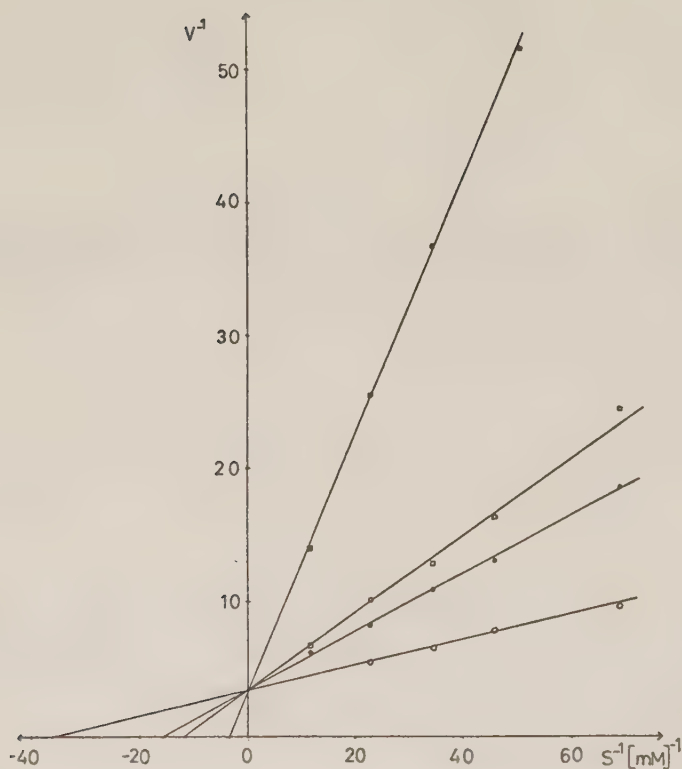


Abb. 30: Hemmung der MDH durch 5- α -Ketobutyrat-NADH

0,0145 - 0,0871 mM NADH, 0,5 mM Oxalacetat und 0,26 μ g/ml MDH (770 U/ mg) in 67 mM Phosphatpuffer pH 7,2; 25°C.

o ohne Inhibitor; • 0,09 μ M 5- α -Ketobutyrate-NADH;
 □ 0,18 μ M 5- α -Ketobut.-NADH; ■ 0,9 μ M 5- α -Ketobut.-NADH

Für NADH $K_M = 2,74 \times 10^{-5}$ M

Für 5- α -Ketobutyrate-NADH $K_I = 0,89 \times 10^{-7}$ M

NADH stark hemmend auf die Reaktionsgeschwindigkeit der Oxydation von Oxalacetat durch MDH. Ausmaß und Art der Hemmung wurden durch kinetische Messungen, wie sie in Abschnitt 3.2.3. für 5- α -Ketobutyrat-NAD beschrieben, untersucht. Gemessen wurde die Reaktionsgeschwindigkeit mit und ohne Hemmstoff bei verschiedenen NADH-Konzentrationen. Abb. 30 zeigt die graphische Auswertung der Meßreihen und den daraus errechneten K_i - bzw. K -Wert.

Aus der Lage des Schnittpunktes der Geraden ist die kompetitive Hemmung zu erkennen, d.h. 5- α -Ketobutyrat-NADH wird an der Coenzym-Bindungsstelle der MDH gebunden.

Da weder intramolekulare Hydridübertragung noch coenzymanaloge Oxydation des NADH-Teils stattfinden, bedeutet dies, daß der Substrat-Teil des Coenzym-Substrat-Modells die Anlagerung von Oxalacetat verhindert, sich aber auch nicht so anordnet, wie das natürliche Substrat im ternären Komplex der MDH. Es wäre z.B. denkbar, daß die zusätzliche Carboxylgruppe des Oxalacetats die richtige Orientierung des Substrats bewirkt. Das Coenzym-Substrat-Modell besitzt nur eine Carboxyl-Gruppe, die mit einer basischen Gruppe in Wechselwirkung treten kann. Ist dies die basische Gruppe, die die endstellige Carboxyl-Gruppe des Oxalacetats im ternären Komplex über ionische Wechselwirkung bindet, so hat das zur Folge, daß der Substrat-Teil des Coenzym-Substrat-Modells nicht die für die Hydridübertragung erforderliche Orientierung besitzt. Schematisch ist dies in Abb. 31 dargestellt.

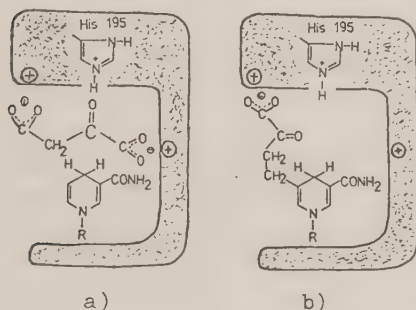


Abb. 31: a) ternärer Komplex aus MDH:NADH:Oxalacetat
b) Komplex aus MDH:5- α -Ketobutyrat-NADH

Aus Röntgenstrukturdaten ist bekannt, daß die MDH eine der LDH sehr ähnliche Konformation hat (75, 76). Modifizierungen der Arginine im aktiven Zentrum ergaben für die MDH 4 Arginine, statt 3 Arginine wie bei der LDH. Diese zusätzliche positive Ladung mag im engen Zusammenhang mit der Spezifität der MDH zum Oxalacetat als Substrat stehen. Die starke Hemmung läßt vermuten, daß das 5- α -Ketobutyrat-NADH außer über Coenzym-Enzym-Wechselwirkungen noch mit seinem Substrat-Teil ionische Bindungen mit der MDH eingeht. In Abschnitt 3.3.7. wird die Untersuchung der Hemmung der MDH durch 5- α -Ketobutyrat-NADH mit der Hemmung anderer Enzyme verglichen.

Die D-Glycerat-DH katalysiert die Reduktion von Hydroxypyruvat:



Hydroxypyruvat besitzt eine zusätzliche Hydroxylgruppe am C-3 des Pyruvats. Wieder wurde statt NADH und Hydroxypyruvat das 5- α -Ketobutyrat-NADH eingesetzt. Auch diese Dehydrogenase katalysiert die Hydridübertragung nicht. Eine coenzymanalogue Oxidation des NADH-Teils von 5- α -Ketobutyrat-NADH in Gegenwart von Hydroxypyruvat ist auch nicht möglich. Da die Hemmung von D-Glycerat-DH durch 5- α -Ketobutyrat-NADH verglichen mit der Hemmung der MDH nur sehr gering ist (siehe Abschnitt 3.3.7.), wurden keine weiteren Untersuchungen mit der D-Glycerat-DH durchgeführt.

3.3.6. Biochemische Eigenschaften von 5- α -Ketobutyrat-NADH gegenüber Dehydrogenasen, die Substrate ohne Carboxyl-Gruppe reduzieren

Zu dieser Klasse der NAD-abhängigen Dehydrogenasen gehört die in ihrer Primär- und Tertiär-Struktur weitgehend bekannte ADH (77, 78). Die röntgenstrukturanalytischen Untersuchungen ergaben, daß der Coenzym-Bindungs-Teil der ADH die gleiche Ter-

tiär-Struktur wie die LDH hat. Ein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Enzymen ist die Beteiligung eines Zn-Atoms an der Bindung und Katalyse des Substrats bei der ADH.

Die Untersuchungen mit 5- α -Ketobutyrat-NAD in Abschnitt 3.2.3. haben gezeigt, daß die ADH aus Pferdeleber gehemmt wird, der Coenzym-Teil aber nicht an der Coenzymbindungsstelle der ADH gebunden wird. Dementsprechend wurde mit 5- α -Ketobutyrat-NADH weder eine Hydridübertragung noch eine coenzymanaloge Oxydation beobachtet. Auch die GAPDH und die Glycerin-DH, die Glycerinaldehyd-3-Phosphat bzw. Dihydroxyaceton enzymatisch reduzieren, katalysieren weder eine Hydridübertragung noch die coenzymanaloge Oxydation des NADH-Teils bei 5- α -Ketobutyrat-NADH. Die Untersuchung der Hemmung dieser Dehydrogenasen durch 5- α -Ketobutyrat-NADH sind zusammen mit der Hemmung anderer Dehydrogenasen im nächsten Abschnitt beschrieben.

3.3.7. Hemmung verschiedener Dehydrogenasen durch 5- α -Ketobutyrat-NAD und 5- α -Ketobutyrat-NADH

Nachdem in den vorangegangenen Abschnitten in erster Linie die Hydridübertragung und die coenzym- bzw. substratanaloge Umsetzung von 5- α -Ketobutyrat-NADH untersucht worden ist, sollen in diesem Abschnitt die Ergebnisse der Hemmung verschiedener Dehydrogenasen durch 5- α -Ketobutyrat-NAD und 5- α -Ketobutyrat-NADH beschrieben und diskutiert werden.

Bei den Versuchen ist zu unterscheiden zwischen der Reaktion von $\text{NAD} \rightarrow \text{NADH}$ und $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}$. Es wurde die Aktivität der Dehydrogenase ohne und mit 5- α -Ketobutyrat-NAD und -NADH als Hemmstoff gemessen. Die Hemmungen, in % angegeben, sind in Tabelle 11 für die Reaktion $\text{NAD} \rightarrow \text{NADH}$ und in Tabelle 12 für die Reaktion $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}$ zusammengestellt.

Betrachtet man die Hemmung der Reaktion $\text{NAD} \rightarrow \text{NADH}$, so sieht

Tab. 11: % Hemmung der Reaktion $\text{NAD} \rightarrow \text{NADH}$

	5- α -Ketobutyrat-NAD		5- α -Ketobutyrat-NADH	
	0,44 mM	4,4 mM	0,044 mM	0,44 mM
LDH	0,0	11,9	12,7	46,0
D-LDH	14,8	51,6	25,6	65,5
MDH	0,0	21,6	0,0	47,9
ADH (Leber)	4,3	9,1	0,0	5,1

Tab. 12: % Hemmung der Reaktion $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}$

	5- α -Ketobutyrat-NAD		5- α -Ketobutyrat-NADH	
	0,44 mM	4,4 mM	0,044 mM	0,44 mM
LDH	5,5	39,9	89,1	100,0
D-LDH	2,5	32,5	36,1	84,6
Alanin-DH	3,1	49,0	6,1	16,9
MDH	18,3	73,9	95,2	100,0
Glycerat-DH	0,0	5,9	11,4	45,7
ADH (Leber)	0,0	14,2	0,0	6,1
GAPDH	---	---	5,2	11,2
Glycerin-DH	1,9	18,7	10,0	28,5

man, daß bei gleicher Konzentration (eingekreiste Werte) das NADH-Derivat stärker hemmt als das NAD-Derivat. Obwohl für die ADH eine nichtkompetitive Hemmung durch 5- α -Ketobutyrat-NAD gemessen worden ist (Abschnitt 3.2.3.), unterscheidet sich das Ausmaß der Hemmung der ADH durch 5- α -Ketobutyrat-NAD nicht wesentlich von der Hemmung der LDH und MDH, die beide kompetitiv durch 5- α -Ketobutyrat-NAD gehemmt werden. 5- α -Ketobutyrat-NADH hemmt dagegen die ADH (5 % Hemmung) schwächer als die LDH (46 % Hemmung) und die MDH (48 % Hemmung). Die D-LDH wird mit 65 % Hemmung stärker gehemmt als die LDH.

Bei der Betrachtung der Hemmung der Reaktion $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}$ in Tabelle 12 fällt sofort die besonders starke Hemmung der LDH und der MDH durch 5- α -Ketobutyrat-NADH auf. In Abschnitt 3.3.4. ist die Hemmung der MDH schon untersucht worden. Es handelt sich um eine kompetitive Hemmung mit einem der Stärke der Hemmung entsprechend kleinen K_I -Wert (10^{-7} M). Zum Vergleich wurde nach der gleichen Methode Art und Ausmaß der LDH-Hemmung durch 5- α -Ketobutyrat-NADH bestimmt. Die von der LDH katalysierte intramolekulare Hydridübertragung kann wegen der geringen Umsatzgeschwindigkeit vernachlässigt werden. In Abbildung 32 und der anschließenden Tabelle 13 sind die Meßergebnisse mit den errechneten K_I -Werten der LDH-Hemmung dargestellt.

Die Art der Hemmung der LDH ist erwartungsgemäß kompetitiv. Der Vergleich der K_I -Werte zeigt, daß in beiden Fällen der K_I -Wert ungefähr 10^{-7} M beträgt und damit auf eine sehr feste Bindung zwischen 5- α -Ketobutyrat-NADH und der LDH bzw. MDH hinweist. Eine vergleichbar große kompetitive Hemmwirkung ist mit anderen NADH-Derivaten bislang noch nicht gefunden worden. Das von Kaplan und Mitarbeiter (45) hergestellte NADH-Derivat, das am C-4 des Nicotinamidringes Pyruvat kovalent gebunden hat, hemmt die LDH nur mit einem K_I -Wert von 10^{-5} M.

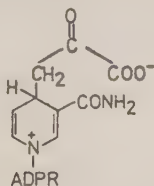


Abb. 33: 4-Pyruvat-NADH

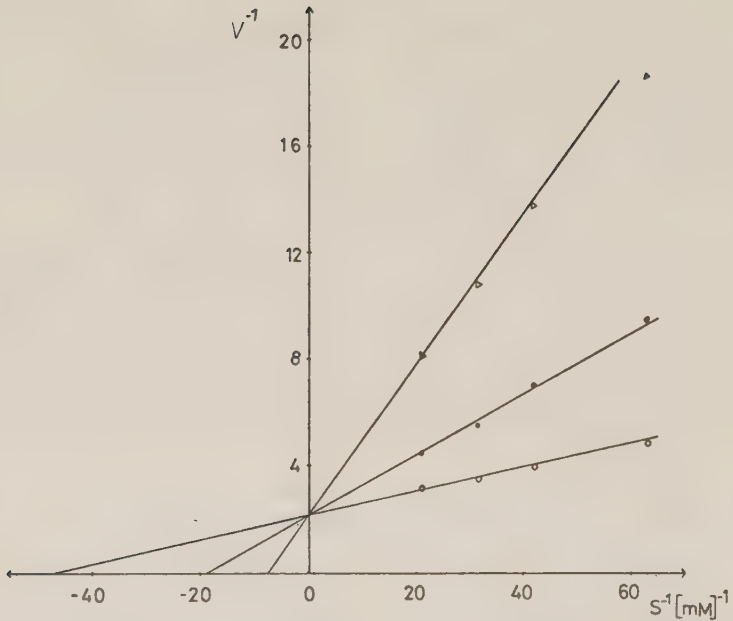


Abb. 32: Hemmung der LDH H_4 durch 5- α -Ketobutyrate-NADH
 0,0158 - 0,0475 mM NADH, 0,5 mM Pyruvat, 0,26 $\mu g/ml$ LDH
 (423 U/mg) in 67 mM Phosphat-Puffer pH 7,2 ; 25°C.
 o ohne Inhibitor; • 0,174 μM 5- α -Ketobutyrate-NADH;
 Δ 0,87 μM 5- α -Ketobutyrate-NADH.

Tab. 13: K_M - und K_I -Werte

	K_M für NADH	K_I für 5- α -Ketobut.-NADH
LDH	$2,11 \times 10^{-5} M$	$1,35 \times 10^{-7} M$
MDH	$2,74 \times 10^{-5} M$	$0,89 \times 10^{-7} M$

Bei diesem 4-Pyruvat-NADH kann wegen der kovalenten Bindung am C-4 des Nicotinamidringes die LDH keine Hydridübertragung katalysieren. 4-Pyruvat-NADH gebunden an die LDH wird aufgrund von enzymatischen Untersuchungen von Kaplan (79) und röntgenstrukturanalytischen Untersuchungen von Rossmann (8) als abortiver Komplex der LDH beschrieben, in dem die LDH die gleiche Konformation wie im abortiven LDH:NAD:Pyruvat-Komplex hat. Da 5- α -Ketobutyrat-NADH und LDH aufgrund der Hydridübertragung einen "ternären Komplex" bilden, läßt sich aus dem Vergleich der Hemmung der LDH durch beide NADH-Derivate sagen, daß im ternären Komplex Substrat und Coenzym fester gebunden werden als im abortiven.

Bei der MDH hat man aufgrund der fehlenden Hydridübertragung keinen Anhaltspunkt darüber, ob 5- α -Ketobutyrat-NADH analog NADH und Oxalacetat im ternären Komplex gebunden wird. Die gleich starke Hemmung wie bei der LDH weist aber darauf hin, daß sowohl Coenzym als auch Substrat-Teil des 5- α -Ketobutyrat-NADH's Wechselwirkungen mit Aminosäure-Resten des akt. Zentrums der MDH eingehen müssen.

Im Gegensatz zur starken Hemmung der LDH durch 5- α -Ketobutyrat-NADH ist die Hemmung der D-LDH nicht so groß. Die fehlende Hydridübertragung durch die D-LDH zeigt bereits, daß sich keine dem ternären Komplex analoge Bindung zwischen 5- α -Ketobutyrat-NADH und der D-LDH ausbildet. Dementsprechend ist auch die Hemmung der D-LDH schwächer als die der LDH.

Die Restaktivitäten der übrigen Dehydrogenasen deuten auf keine große Hemmung durch 5- α -Ketobutyrat-NADH hin. Auch die Hemmung der L-Alanin-DH unterscheidet sich nicht von der Hemmung der übrigen Dehydrogenasen. Dies ist sehr erstaunlich, da die L-Alanin-DH die intramolekulare Hydridübertragung katalysiert, was auf die Bildung eines ternären Komplexes deutet. Die im Vergleich zur LDH schwache Hemmung der L-Alanin-DH mag mit dem unterschiedlichen Mechanismus der Katalyse, der die Beteiligung von Ammonium-Ionen bei der L-Alanin-DH einschließt, begründet sein.

Vergleicht man in Tabelle 12 die Hemmung durch 5- α -Ketobutyrat-NAD mit der durch 5- α -Ketobutyrat-NADH, so sieht man wie schon in Tabelle 11, daß das NAD-Derivat bei gleichen Konzentrationen nicht nur schwächer hemmt, sondern auch keine großen Unterschiede bei der Hemmung verschiedener Dehydrogenasen bewirkt. Die Hemmung von LDH, D-LDH, Alanin-DH und MDH einerseits und ADH, Glycerat-DH und Glycerin-DH andererseits unterscheiden sich nur geringfügig (um ca. 20 - 50 %).

Die in Tabelle 11 und 12 beobachtete geringe Hemmung des NAD-Derivats gegenüber dem NADH-Derivat ist darauf zurückzuführen, daß es sich bei dem 5- α -Ketobutyrat-NAD nicht um ein Coenzym-Substrat-Modell handelt und daß NAD-Derivate wie das NAD schlechter gebunden werden als NADH und die NADH-Derivate.

3.3.8. Diskussion des biochemischen Verhaltens von 5- α -Ketobutyrat-NADH

5- α -Ketobutyrat-NADH ist nicht nur von seinem chemischen Aufbau her ein Coenzym-Substrat-Modell, es wird auch von zwei Dehydrogenasen als ein solches Modell akzeptiert, indem diese Dehydrogenasen eine intramolekulare Hydridübertragung vom Coenzym-Teil auf den Substrat-Teil katalysieren. Diese zwei Dehydrogenasen sind die LDH und die L-Alanin-DH, die beide Pyruvat als Substrat und NADH als Coenzym binden. Eine weitere Gemeinsamkeit dieser beiden Dehydrogenasen besteht in der gleichen stereospezifischen Hydridübertragung, bei der aus dem α -C-Atom des oxydierten Substrats die L-Konfiguration am α -C-Atom des Produktes entsteht. Da die D-LDH die Hydridübertragung nicht katalysiert, obwohl die D-LDH das gleiche Substrat wie die LDH bindet, muß die Anordnung von Enzym:Coenzym:Substrat im ternären Komplex bei beiden Lactatdehydrogenasen unterschiedlich sein.

Dehydrogenasen, die pyruvat-ähnliche Substrate reduzieren, katalysieren die intramolekulare Hydridübertragung nicht, d.h. 5- α -Ketobutyrat-NADH ist für diese Dehydrogenasen kein Coenzym-Substrat-Modell. Dieses Verhalten unterstreicht die große Spezifität der Dehydrogenasen gegenüber ihrem Substrat und die exakte Kopierung des "Transition-State" durch das synthetisierte 5- α -Ketobutyrat-NADH. Eine gewisse Ähnlichkeit der ternären Komplexe von LDH und MDH muß trotz der verschiedenen Substrate doch noch vorhanden sein, denn beide Enzyme werden durch 5- α -Ketobutyrat-NADH annähernd gleich stark gehemmt. Dehydrogenasen, die Substrate reduzieren, deren Struktur sich von der des Pyruvats stark unterscheidet, katalysieren die Hydridübertragung nicht und werden von 5- α -Ketobutyrat-NADH auch nur schwach gehemmt.

Aus dem biochemischen Verhalten von 5- α -Ketobutyrat-NADH gegenüber verschiedenen NAD-abhängigen Dehydrogenasen lassen sich zwei Eigenschaften der Dehydrogenasen zeigen:

- 1.) Die spezifische Affinität des Enzyms zu einem bestimmten Substrat. Diese Spezifität ist durch die Primär- und Tertiär-Struktur der Enzyme festgelegt.
- 2.) Die unterschiedliche Struktur von LDH und D-LDH, die aus Pyruvat die chemisch gleichen Produkte mit anderer Konfiguration herstellen.

3.4.0. Biochemische Eigenschaften von 5- α -Hydroxybutyrat-NAD

Bei der von LDH katalysierten Hydridübertragung entsteht aus 5- α -Ketobutytrat-NADH das 5- α -Hydroxybutyrat-NAD. Zur Identifizierung dieses NAD-Derivats wurde 5- α -Hydroxybutyrat-NAD chemisch synthetisiert (Abschnitt 2.2.2.). 5- α -Hydroxybutyrat-NAD ist ebenfalls ein Coenzym-Substrat-Modell, denn am oxydierten Coenzym ist das reduzierte Substrat Lactat covalent über eine Methylen-Brücke gebunden. Da das Gleichgewicht der von der LDH katalysierten Reaktion wegen des ungünstigeren Redoxpotentials von NAD weit auf der Seite des Lactats liegt, ist eine von der LDH katalysierte intramolekulare Hydridübertragung beim 5- α -Hydroxybutyrat-NAD, das ein noch negativeres Redoxpotential als NAD hat, nur im alkalischen unter gleichzeitiger Entfernung des Produkts mit Hydrazin aus dem Gleichgewicht möglich. Da es sich bei dem chemisch synthetisierten 5- α -Hydroxybutyrat-NAD um ein racemisches Gemisch bezüglich der Konfiguration der α -Hydroxyl-Gruppe im Substratteil handelt, war die Bestimmung der maximalen Umsatzgeschwindigkeit und des K_M -Wertes nicht möglich. Qualitative Messungen werden zur Zeit im Rahmen einer Diplomarbeit mit optisch einheitlichem 5- α -(L-Hydroxybutyrat)-NAD durchgeführt.

Mit dem racemischen 5- α -Hydroxybutyrat-NAD und -NADH wurde wie in Abschnitt 3.3.7. die Hemmung der Reaktion $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}$ katalysiert von verschiedenen Dehydrogenasen gemessen. In Tabelle 14 sind die Werte der Hemmung eingetragen. Auffällig ist, daß 5- α -Hydroxybutyrat-NAD als Coenzym-Substrat-Modell keine spezifische Hemmung wie das 5- α -Ketobutytrat-NADH zeigt. 5- α -Hydroxybutyrat-NADH hemmt dagegen die MDH in einem entsprechenden Ausmaß wie 5- α -Ketobutytrat-NADH. Die LDH wird dagegen schwächer gehemmt als die D-LDH.

Sehr aussagekräftig sind diese Ergebnisse nicht, weil es sich um die racemische Verbindung handelt. Es müssen daher die Ergebnisse mit dem optisch einheitlichen 5- α -(L-Hydroxybutyrat)-NAD abgewartet werden.

Tab. 14: % Hemmung der Reaktion $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}$

	5- α -Hydroxybut.-NAD		5- α -Hydroxybut.-NADH	
	0,44 mM	4,4 mM	0,044 mM	0,44 mM
LDH	6,2	27,4	0,0	34,1
MDH	20,0	72,2	92,7	100,0
D-LDH	--	--	25,4	78,5
ADH (Leb.)	13,0	20,0	0,0	25,6

3.5.0. Biochemische Eigenschaften von 5-Carboxy-NADH

Während meiner Diplomarbeit habe ich das 5-Carboxy-NAD synthetisiert und seine biochemischen Eigenschaften gegenüber verschiedenen Dehydrogenasen untersucht. Auffällig war die fehlende enzymatische Reduktion zum 5-Carboxy-NADH durch die untersuchten Dehydrogenasen LDH, MDH und ADH. Dies ist um so erstaunlicher, da das Redoxpotential von 5-Carboxy-NAD aufgrund der zusätzlichen elektronenziehenden Gruppe günstiger ist als das des NAD's und da außerdem gezeigt werden konnte, daß 5-Carboxy-NAD an der Coenzym-Bindungsstelle angelagert wird (mit der ADH erhielt man eine gemischte kompetitive und nichtkompetitive Hemmung). Das durch chemische Reduktion erhaltene 5-Carboxy-NADH (Abschnitt 2.2.3.) besitzt im Gegensatz zu 5- α -Ketobutyrat-NADH keinen Substrat-Teil. Es läßt sich daher gut zum Vergleich mit dem Coenzym-Substrat-Modell heranziehen, aus dem abzuschätzen ist, inwieweit der Substrat-Teil durch zusätzliche Bindungen die Affinität des Enzyms zum Coenzym-Substrat-Modell vergrößert.

3.5.1. Bindung von 5-Carboxy-NADH an verschiedene Dehydrogenasen

5-Carboxy-NADH wird von verschiedenen Dehydrogenasen in Anwesenheit des jeweiligen Substrats nicht coenzymanalogue reduziert. Als Dehydrogenasen wurden die LDH, MDH, ADH und L-Alanin-DH untersucht. Um die Ursachen für dieses Verhalten näher zu untersuchen, wurden Fluoreszenz-Messungen mit 5-Carboxy-NADH und den Dehydrogenasen durchgeführt.

In Abschnitt 2.2.7. ist die Fluoreszenz von 5-Carboxy-NADH beschrieben. Die Intensität der Fluoreszenz von 5-Carboxy-NADH erhöht sich bei Zugabe von LDH, MDH und ADH. Gleichzeitig verschiebt sich die Lage des Emissionsmaximums etwas zu kleineren Wellenlängen. Abbildung 43 zeigt die Emissionsspektren von 5-Carboxy-NADH ohne und mit LDH H_4 .

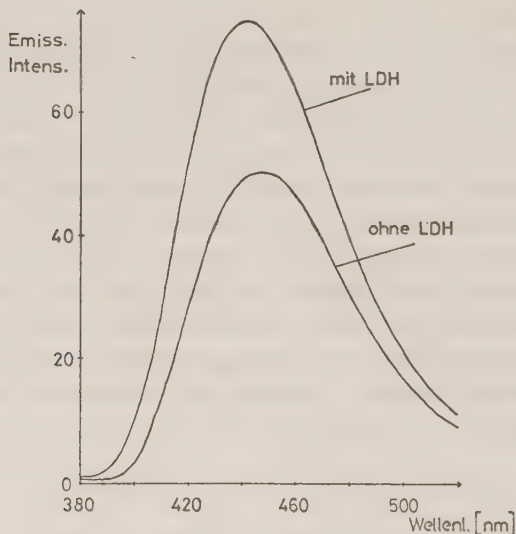


Abb. 43: Emissionsspektrum von 5-Carboxy-NADH ohne und mit

Die Änderung der Fluoreszenz von 5-Carboxy-NADH ist wie beim NADH auf die Bildung eines binären Enzym:5-Carboxy-NADH-Komplexes zurückzuführen. Analog den Messungen mit NADH als Coenzym und LDH (80), MDH (81) bzw. ADH (82) als Enzym wurde die Fluoreszenz-Titration mit 5-Carboxy-NADH als Coenzym durchgeführt. (siehe Material und Methoden 6.6.0.). Die Werte der Fluoreszenzänderung in Abhängigkeit von der Coenzymkonzentration aufgetragen ergeben die Dissoziationskurve für den jeweiligen Enzym-Coenzym-Komplex. Mit dem aus der Dissoziationskurve erhaltenen Endwert der Fluoreszenzerhöhung bei Absättigung aller Coenzym-Bindungsstellen läßt sich durch Auftragung nach der von Scatchard entwickelten Methode die Dissoziationskonstante K_D und die Zahl der Bindungsstellen pro Untereinheit Enzym bestimmen.

In Tabelle 15 sind diese Werte für NADH und 5-Carboxy-NADH eingetragen. Die Ergebnisse zeigen, daß sich bei allen untersuchten Dehydrogenasen ein binärer Enzym:5-Carboxy-NADH-Komplex bildet. Vergleicht man die K_D -Werte von 5-Carboxy-NADH mit denen von NADH, so stellt man fest, daß die Festigkeit der Bindung von 5-Carboxy-NADH im binären Komplex sich nicht wesentlich von der Festigkeit mit der NADH von dem gleichen Enzym gebunden wird unterscheidet. Damit ist gezeigt worden, daß die zusätzliche Carboxy-Gruppe die Bildung des binären Komplexes nicht stört. Das gleiche gilt auch für die Zahl der Bindungsstellen pro Untereinheit. Nur bei der ADH (Leber) liegt der Wert etwas höher, was auf eine zusätzliche Bindung

Tab. 15: Dissoziationskonstanten und Zahl der Bindungsstellen

	NADH		5-Carboxy-NADH	
	K_D	Bd./UE	K_D	Bd./UE
LDH	0,40 μ M	1/1	2,57 μ M	1,24/1
MDH	0,31 μ M	1/1	2,59 μ M	0,96/1
ADH (Leber)	2,16 μ M	1/1	10,10 μ M	1,50/1

von 5-Carboxy-NADH außerhalb des aktiven Zentrums hinweist und was mit der gemischten kompetitiven und nicht kompetitiven Hemmung der ADH durch 5-Carboxy-NADH übereinstimmt.

Die Ursache der fehlenden Coenzymaktivität beim 5-Carboxy-NADH mit LDH als Dehydrogenase wird durch die Untersuchungen mit der substratanalogen Verbindung Oxamat deutlich. Gibt man zum binären LDH:NADH-Komplex Oxamat hinzu, so wird die Coenzymfluoreszenz gequencht, was auf die Bildung eines abortiven ternären Komplexes zurückzuführen ist (83). Macht man den gleichen Versuch mit 5-Carboxy-NADH, so tritt keine Veränderung der Fluoreszenz-Intensität auf. Damit ist die in meiner Diplomarbeit aufgestellte Vermutung, daß die zusätzliche Carboxyl-Gruppe die Bildung eines ternären Komplexes verhindert, bestätigt.

Das gleiche Ergebnis findet man mit der ADH. Gibt man zu einem binären ADH:5-Carboxy-NADH-Komplex Acetamid, so ändert sich die Fluoreszenzintensität nicht. Mit NADH als Coenzym findet dagegen eine Fluoreszenzerhöhung statt (84).

Mit 5- α -Ketobutyrat-NADH wurden ebenfalls Fluoreszenz-Messungen in Gegenwart der MDH und ADH durchgeführt. Wie in Abschnitt 2.2.7. beschrieben wurde, ist die Fluoreszenz-Intensität von 5- α -Ketobutyrat-NADH ohne Enzym sehr gering (ca. $1/4$ der NADH-Intensität). Dementsprechend änderte sich bei Anwesenheit der MDH oder ADH die Fluoreszenz-Intensität von 5- α -Ketobutyrat-NADH aufgrund der Bildung eines binären Komplexes nicht nennenswert. Proteinfluoreszenz-Messungen wurden nicht durchgeführt, da auch dabei mit keiner großen Änderung der Intensität zu rechnen ist.

3.5.2 Hemmung verschiedener Dehydrogenasen durch 5-Carboxy-NADH

Analog den in Abschnitt 3.3.7. beschriebenen Versuchen wurde die Hemmung verschiedener Dehydrogenasen durch 5-Carboxy-NADH

gemessen. In Tab. 16 sind die Restaktivitäten der Reaktion $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}$ katalysiert von verschiedenen DH eingetragen. Aus dem Ergebnis kann man ablesen, daß 5-Carboxy-NADH sich anders verhält als das Coenzym-Substrat-Modell 5- α -Ketobutyrat-NADH, denn es tritt keine besonders starke Hemmung von LDH und MDH auf. Die Hemmung durch 5-Carboxy-NADH kann nur durch die Wechselwirkung mit der Coenzym-Bindungsstelle zustande kommen. Da der K_D -Wert von 5-Carboxy-NADH gebunden an ADH annähernd gleich groß ist wie der K_D -Wert von 5-Carboxy-NADH gebunden an LDH, hemmt 5-Carboxy-NADH die beiden Dehydrogenasen auch nicht unterschiedlich stark. Da 5- α -Ketobutyrat-NADH bei gleicher Konzentration die LDH stärker hemmt, so geschieht dies aufgrund zusätzlicher Wechselwirkungen des Substrat-Teils mit dem Enzym. Der Vergleich zwischen 5-Carboxy-NADH und 5- α -Ketobutyrat-NADH bestätigt, daß 5- α -Ketobutyrat-NADH ein Coenzym-Substrat-Modell ist.

Tab. 16: % Hemmung der Reaktion $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}$

	5-Carboxy-NADH		5-Carboxy-NAD	
	0,044 mM	0,44 mM	0,44 mM	4,4 mM
LDH	0,0	37,3	6,7	30,3
D-LDH	11,5	30,8	--	--
Alanin-DH	6,5	23,0	--	--
MDH	6,8	62,3	18,8	39,2
ADH (Leber)	6,7	51,7	11,1	35,4

4.0.0. Zusammenfassung der Ergebnisse

A) Im Mittelpunkt der synthetischen Arbeiten stand die Synthese von 5- α -Ketobutyrat-NADH, einem NADH-Derivat, das über eine zusätzliche Methylenbrücke am C-5 des Nicotinamidringes Brenztraubensäure gebunden hat. Die Synthese dieses bislang ersten Coenzym-Substrat-Modells einer NAD-abhängigen Dehydrogenase erfolgte in drei Abschnitten:

- 1) Synthese von 5- α -Ketobutyrat-Nicotinamid aus 5-Cyano-Nicotinsäure
- 2) Synthese von 5- α -Ketobutyrat-NAD mit Hilfe von NAD-Glycohydrolase, die den Austausch des Nicotinamidrings im NAD gegen 5- α -Ketobutyrat-Nicotinamid katalysiert.
- 3) Chemische Reduktion des Coenzym-Teils von 5- α -Ketobutyrat-NAD, wodurch das 5- α -Ketobutyrat-NADH entsteht.

Daneben wurden zu Vergleichszwecken die folgenden neuen NAD- und NADH-Derivate nach der gleichen Methode hergestellt:

5- α -Hydroxybutyrat-NAD, 5- α -Hydroxybutyrat-NADH, 5-Carboxy-NADH.

Reinheit, Struktur, chemische und physikalische Eigenschaften der NAD- und NADH-Derivate wurden nach verschiedenen Methoden untersucht.

B) Im biochemischen Teil der Arbeit wurden die hergestellten Nicotinamid-, NAD- und NADH-Derivate auf ihre Eigenschaft als Coenzym-Substrat-Modell und als substrat- bzw. coenzym-analoge Verbindung gegenüber verschiedenen NAD-abhängigen Dehydrogenasen untersucht. Es wurden die folgenden Ergebnisse erhalten:

- 1) Die Nicotinamid-Derivate, 5- α -Ketobutyrat- und 5- α -Hydroxybutyrat-Nicotinamid werden von der LDH substrat-analog umgesetzt.
- 2) Im 5- α -Ketobutyrat-NAD liegen Substrat- und Coenzym-Teil beide in der oxydierten Form vor. Der Substrat-Teil

wird von der LDH und D-LDH substratanalog zum Lactat-Rest reduziert. Die coenzymanaloge Reduktion des NAD-Teils wird weder von der LDH oder D-LDH noch von anderen NAD-abhängigen Dehydrogenasen katalysiert. Für die LDH wurde gezeigt, daß 5- α -Ketobutyrat-NAD sowohl an der Coenzym- als auch an der Substrat-Bindungsstelle des Enzyms angelagert wird und daher die Bildung des ternären LDH:5- α -Ketobutyrat-NAD: Lactat-Komplexes nicht möglich ist. Der ternäre LDH:NADH:5- α -Ketobutyrat-NAD-Komplex ist wegen der größeren Affinität der LDH zu NADH möglich, so daß die substratanaloge Reduktion stattfindet.

- 3) Beim 5- α -Ketobutyrat-NADH wird durch die LDH H_4 und LDH M_4 eine intramolekulare Hydridübertragung vom Dihydropyridinring auf die α -Ketogruppe des Brenztraubensäure-Rests katalysiert. Die Struktur des dabei entstehenden NAD-Derivats wurde als 5- α -Hydroxybutyrat-NAD bestätigt. Die Hydridübertragung erfolgt nach einem intramolekularen Mechanismus, der stereospezifisch abläuft, so daß nur die L-Konfiguration des Lactat-Teils entsteht. Die charakteristischen Größen K_M und V_{max} weisen zusammen mit den Ergebnissen der kinetischen Messungen darauf hin, daß 5- α -Ketobutyrat-NADH ein für die LDH spezifisches "Transition-State-Analogon" der enzymkatalysierten Umwandlung von Pyruvat zum Lactat ist.
- 4) Die D-LDH katalysiert die intramolekulare Hydridübertragung nicht, sondern setzt 5- α -Ketobutyrat-NADH nur substratanalog um. Hieraus läßt sich der unterschiedliche Aufbau des ternären Komplexes bei LDH und D-LDH ableiten. Gleichzeitig bestätigt dies die Spezifität, mit der das Modell den Übergangszustand der Hydridübertragung bei der LDH zeigt.
- 5) Die L-Alanin-DH, die die reduktive Aminierung des Pyruvats zum L-Alanin in Gegenwart von Ammonium-Ionen katalysiert, kann die reduktive Aminierung auch bei 5- α -Keto-

butyrat-NADH in Gegenwart von Ammonium-Ionen katalysieren. Es entsteht das als 5- α -Aminobutyrat-NAD identifizierte NAD-Derivat. Die Hydridübertragung läuft wie bei der LDH intramolekular ab. Da für die Umsetzung Ammonium-Ionen benötigt werden, muß die Reaktion analog dem von Goldmann angegebenen Mechanismus über das 5- α -Iminobutyrat-NADH laufen, aus dem nach der Hydridübertragung das 5- α -Aminobutyrat-NAD entsteht. Der gleiche K_m -Wert von 5- α -Ketobutyrat-NADH und NADH zeigt, daß es sich bei dem 5- α -Ketobutyrat-NADH um ein spezifisches Modell des Übergangszustands der von L-Alanin-DH katalysierten Umsetzung handelt, und daß die Übergangszustände von LDH und L-Alanin-DH gleich oder aber sehr ähnlich sein müssen.

- 6) Die Hydridübertragung bei 5- α -Ketobutyrat-NADH wird von der MDH und der D-Glycerat-DH, zwei Dehydrogenasen, die pyruvatähnliche Substrate reduzieren, nicht katalysiert. Auch eine coenzymanaloge Oxydation des NADH-Teils wurde mit beiden Dehydrogenasen nicht beobachtet. Lediglich die annähernd gleich starke kompetitive Hemmung der MDH und der LDH weist auf eine ähnliche Struktur des aktiven Zentrums hin.
- 7) NAD-abhängige Dehydrogenasen, die Substrate ohne Carboxylgruppe reduzieren, z.B. die ADH, GAP-DH und Glycerin-DH katalysieren weder die Hydridübertragung bei 5- α -Ketobutyrat-NADH, noch oxydieren sie den NADH-Teil. Im Fall der ADH wurde mit 5- α -Ketobutyrat-NAD gezeigt, daß eine Bindung im aktiven Zentrum nicht stattfindet. Die Hemmung der Dehydrogenasen durch 5- α -Ketobutyrat-NADH ist nur schwach im Vergleich zur Hemmung von LDH und MDH.
- 8) Bei dem Coenzym-Substrat-Modell, 5- α -Hydroxybutyrat-NAD katalysiert die LDH die Hydridübertragung ausgesprochen langsam. Zwei Gründe sind dafür verantwortlich; das ungünstige Gleichgewicht der Reaktionen; das für 5- α -Hydroxybutyrat-NADH aufgrund seines negativen Redoxpotentials

gegenüber NAD noch ungünstiger ist und die Tatsache, daß es sich um ein racemisches Gemisch mit D- und Lactat-Rest handelt.

- 9) Fluoreszenzmessungen zeigen, daß 5-Carboxy-NADH von der LDH und der ADH in einem binären Komplex annähernd gleich fest gebunden wird wie NADH. Ein ternärer Komplex mit 5-Carboxy-NADH als Coenzym bildet sich bei beiden Enzymen nicht, so daß eine coenzymanaloge Oxydation auch nicht möglich ist.
- 10) Die Eigenschaft der NAD- und NADH-Derivate als Hemmstoff auf die Umsetzungsgeschwindigkeit verschiedener Dehydrogenasen wurde für die Reaktionen $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}$ und $\text{NAD} \rightarrow \text{NADH}$ untersucht. Als Ergebnis wurde gefunden:
 - a) die NAD-Derivate hemmen schwächer als die entsprechenden NADH-Derivate aufgrund der allgemein schwächeren Bindung von NAD gegenüber NADH,
 - b) die verschiedenen NAD-Derivate hemmen die gleiche Dehydrogenase nur wenig unterschiedlich, und andererseits hemmt ein und dasselbe NAD-Derivat Dehydrogenasen mit verschiedenen Substraten in gleichem Ausmaße.
 - c) von den NADH-Derivaten zeigt das 5- α -Ketobutytrat-NADH gegenüber der LDH und der MDH eine sehr starke Hemmung. Die K_1 -Werte von 5- α -Ketobutytrat-NADH liegen bei beiden Dehydrogenasen bei 10^{-7} M und sind bislang noch von keinem bekannten NADH- oder Substrat-Derivat in diesem Ausmaß erreicht worden. Das 5- α -Hydroxybutyrat-NADH hemmt nur die MDH in der gleichen Größenordnung.

M A T E R I A L u n d M E T H O D E N

5.0.0. Synthesen

Die Synthese von 5-Brom-Nicotinsäureäthylester und 5-Cyano-Nicotinsäureäthylester wurden wie in meiner Diplomarbeit beschrieben durchgeführt. 3-Äthoxycarbonyl-5-hydroxymethyl-pyridin, 3-Carboxamido-5-hydroxymethyl-pyridin und 3-Carboxamido-5-formyl-pyridin wurden nach einer Arbeitsvorschrift aus der Dissertationsarbeit von H. Blume (23) synthetisiert.

5.1.0. 4-(5-Carboxamido-3-pyridyl)-2-on-but-3-en-säure

4,5 g (27 mMol) 3-Carboxamido-5-formyl-pyridin werden in 15 ml Methanol aufgeschlemmt. Nach Zugabe von 2,4 g (27 mMol) Brenztraubensäure wird unter Rühren und Kühlung eine Lösung von 2,1 g KOH in 6 ml Methanol zugetropft. Das Gemisch wird sofort klar und nach kurzer Zeit fällt das Kaliumsalz der ungesättigten Säure als hellgelbes Pulver aus. Dieses Produkt wird direkt für die Synthese von 5- α -Ketobutytrat-Nicotinamid verwendet. Für analytische Untersuchungen sowie enzymatische Messungen wurde das Rohprodukt durch Chromatographie an einem Anionenaustauscher (Sephadex - A 25) in der Formiatform gereinigt (Säule 1,2 x 20 cm). Nach der Elution mit Wasser folgt ein linearer Gradient aus je 600 ml Wasser und 0,6 M Ameisensäure. 4-(5-Carboxamido-3-pyridyl)-2-oxo-but-3-en-säure eluiert bei 0,5 M Ameisensäure als Monohydrat. Schmp. = 228 - 230°C (Zers.).

$C_{10}H_8N_2O_4 \times H_2O$ (238.2) Ber. C 50.42 H 4,23 N 11,76
Gef. C 50,70 H 4,17 N 11,75

5.2.0. 4-(5-Carboxamide-3-pyridyl)-2-on-buttersäure (5- α -Ketobutytrat-Nicotinamid)

4,0 g (15 mMol) des Kaliumsalzes von 4-(5-Carboxamido-3-pyridyl)-2-on-but-3-en-säure werden in 50 ml 50 %iger Essigsäure

suspendiert und über 2 g 10 % Palladium auf Bariumsulfat bei Normaldruck hydriert. Der Verlauf der Reaktion kann UV-spektroskopisch verfolgt werden. Die breite Bande bei 280 nm verschwindet unter Bildung einer neuen schmalen Bande bei 270 nm. Nach je 1 Stunde wird vom Katalysator abfiltriert und erneut werden 1,2 g Katalysator hinzugegeben. Nach ca. 3 Stunden ist die Reaktion beendet. Die Lösung wird lyophilisiert und der Rückstand in Wasser gelöst. Die Reinigung erfolgt durch Chromatographie an einem Anionenaustauscher (Sephadex - A 25, Acetatform). Säule 3 x 60 cm. Eluiert wird zunächst Wasser, dann mit einem linearen Gradienten aus je 1000 ml Wasser und 0,7 M Essigsäure. Anschließend wird weiter mit 0,7 M Essigsäure eluiert, wobei 5- α -Ketobutyrat-Nicotinamid im Eluat erscheint, das nach Lyophilisieren als weißes Pulver zurückbleibt. Ausbeute: 0,80 g ($\approx$ 24 % d.T.).

Schmp. 205-7 °C (Zers.).

$C_{10}H_{10}N_2O_4$ (222,2)	Ber.	C 54,05	H 4,54	N 12,61
	Gef.	C 53,89	H 4,59	N 12,57

Das mitentstandene 5- α -Hydroxybutyrat-Nicotinamid wird bei 0,5 M Essigsäure eluiert. Ausbeute: 0,18 g ($\approx$ 8,2 % d.T.).

5.3.0. 4-(5-Carboxamido-3-pyridyl)-2-hydroxy-buttersäure 5- α -Hydroxybutyrat-Nicotinamid

Eine Lösung von 220 mg (1,0 mMol) 5- α -Ketobutyrat-Nicotinamid in 20 ml Wasser, die mit KOH auf pH = 6 eingestellt wurde, wird während 30 Minuten bei 0 °C in eine Lösung von 200 mg (53 mMol) Natriumborhydrid in 7 ml Wasser eingetropft. Nach weiteren 2 Stunden wird das überschüssige Borhydrid durch verd. HCL zersetzt, die Lösung neutralisiert und lyophilisiert. Die Reinigung erfolgte wie bei der Synthese von 5- α -Ketobutyrat-Nicotinamid beschrieben. Ausbeute: 200 mg ($\approx$ 90 % d.T.)

Schmp. = 60°C (Sint.), 210°C (Zers.).

$C_{10}H_{12}N_2O_4$ (224,2)	Ber.	C 53,57	H 5,39	N 12,49
	Gef.	C 53,09	H 5,62	N 12,95

5.4.0. 5-(2-Oxalyl-äthyl)-nicotinamid-adenin-dinucleotid
(5- α -Ketobutyrat-NAD)

Zu einer Lösung von 320 mg (0,48 mMol) NAD und 400 mg (1,8 mMol) 5- α -Ketobutyrat-Nicotinamid, die mit KOH auf pH = 7 eingestellt wurde, gibt man 1,5 ml 1 M Phosphatpuffer pH = 7 und eine Lösung von 834 mg NAD-Glycohydrolase aus Schweinehirn in 6 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH = 7. Die NAD-Glycohydrolase muß vorher in dem Phosphatpuffer durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen werden (siehe Abschnitt 7.2.0.). Man füllt mit Wasser auf 30 ml auf und schüttelt bei 37°C für 3 Stunden. Durch Zugabe von 4 ml 30 %iger Trichloressigsäure wird das Protein gefällt. Man zentrifugiert bei 40.000 g und fällt 5- α -Ketobutyrat-NAD in der Kälte aus dem Überstand durch Zugabe von 250 ml Aceton. Reinigung durch Säulenchromatographie (1,5 x 55 cm) an einem Anionenaustauscher (Sephadex - A 25, Formiatform) und Elution mit Wasser und anschließend mit einem linearen Gradienten aus je 1 l Wasser und 1 M Ameisensäure. 5- α -Ketobutyrat-NAD eluiert bei 1 M Ameisensäure. Nach dem Lyophilisieren und Umfällen aus Wasser mit Aceton erhält man 130 mg ($\hat{=}$ 36 % bezogen auf NAD) 5- α -Ketobutyrat-NAD.

$C_{25}H_{31}N_7O_{17}P_2$ (763,5)	Ber. C 39,33	H 4,09	N 12,84	P 8,11
	Gef. C 39,50	H 4,16	N 12,80	P 7,99

5.5.0. 5-(2-Oxalyl-äthyl)-nicotinamid-adenin-dinucleotid, red.
Form (5- α -Ketobutyrat-NADH)

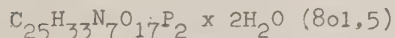
20 mg (0,026 mMol) 5- α -Ketobutyrat-NAD werden mit 4 ml einer wässrigen Lösung von 8,8 mg (0,052 mMol) Natriumdithionit und 4,4 mg (0,052 mMol) Natriumhydrogencarbonat 1 Minute in kochendem Wasserbad erhitzt. Unter Eiskühlung wird anschließend 5 Minuten Luft durch die Lösung gesaugt. Die Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie (1,2 x 25 cm) an einem Anionenaustauscher (Sephadex - A 25, Chloridform). Eluiert wird mit Wasser

und anschließend mit einem linearen Gradienten aus je 400 ml Wasser und 0,35 M Lithiumchlorid. 5- α -Ketobutyrat-NADH wird bei 0,28 M LiCl eluiert. Die entsprechenden Fraktionen werden bei 0,3 Torr und Raumtemperatur am Rotationsverdampfer auf ca. 1 ml eingengt und 5- α -Ketobutyrat-NADH mit 50 ml Isopropanol ausgefällt. UV (Wasser): $\lambda_{\max}$ (log ϵ) = 342 nm (3,78); 260 nm (4,15)

5.6.0. 5-(3-Carboxy-3-hydroxypropyl)-nicotinamid-adenin-dinucleotid (5- α -Hydroxybutyrat-NAD)

A) Synthese aus 4-(5-Carboxamido-3-pyridyl)-2-hydroxy-butansäure

Die Darstellung erfolgte analog der Synthese von 5- α -Ketobutyrat-NAD. 163 mg (0,73 mMol) 5- α -Hydroxybutyrat-Nicotinamid und 240 mg (0,36 mMol) NAD werden mit KOH auf pH 7 eingestellt. Hierzu werden 0,8 ml 1 M Phosphatpuffer pH 7 und 0,628 g durch Ultraschall aktivierte NAD-Glycohydrolase aus Schweinehirn in 4 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7 gegeben. Man füllt auf 15 ml mit Wasser auf und schüttelt bei 37 °C 3 Stunden. Das Protein wird anschließend mit 2 ml 30%iger Trichloressigsäure ausgefällt und bei 40.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wird nach dem Neutralisieren mit KOH auf eine Anionenaustauschersäule gegeben (Sephadex - A 25, Formiatform; 1,7 x 55 cm). Zuerst eluiert man mit Wasser und anschließend mit einem linearen Gradienten aus je 400 ml Wasser und 0,25 M Ameisensäure. Mit 0,2 M Ameisensäure erscheint 5- α -Hydroxybutyrat-NAD im Eluat. Nach dem Lyophilisieren und Umfällen aus Wasser mit Aceton erhält man 90 mg ($\approx$ 32,66 % bezogen auf NAD) 5- α -Hydroxybutyrat-NAD.



Ber. C 37,45 H 4,62 N 12,23 P 7,73

Gef. C 37,23 H 5,08 N 12,16 P 6,90

B) Synthese aus 5- α -Ketobutyrat-NADH mit LDH H₄

7,0 mg (8,95 Mol) 5- α -Ketobutyrat-NADH werden in 19 ml 0,067 M Phosphatpuffer pH = 7,2 gelöst. Hierzu gibt man 1 ml LDH H₄ - Lösung (= 8 mg/ml Protein; 3680 U) und schüttelt bei 30 °C so lange, bis keine weitere Extinktionsabnahme bei 340 nm zu sehen ist. Anschließend wird lyophilisiert. Den Rückstand suspendiert man in wenig Wasser und zentrifugiert die denaturierte LDH bei 40.000 g ab. Aus dem Überstand erhält man nach der säulenchromatographischen Reinigung wie unter A) beschrieben 2,3 mg 5- α -Hydroxybutyrat-NAD.

5.7.0. 5-(3-Carboxy-3-hydroxypropyl)-nicotinamid-adenin-dinucleotid, red. Form (5- α -Hydroxybutyrat-NADH)

10 mg (0,013 mMol) 5- α -Hydroxybutyrat-NAD werden mit 2 ml einer wässrigen Lösung von 4,4 ml (0,026 mMol) Natriumdithionit und 2,2 mg (0,026 mMol) NaHCO₃ 1 Minute in einem kochenden Wasserbad erhitzt. Anschließend saugt man 5 Minuten unter Eiskühlung Luft durch die Lösung. Die Reinigung und Isolierung erfolgt säulenchromatographisch (1,2 x 25 cm) wie bei der Synthese von 5- α -Ketobutyrat-NADH beschrieben. Gradient: 0 - 0,3 N Lithiumchlorid. 5- α -Hydroxybutyrat-NADH eluiert bei 0,25 N LiCl. UV (Wasser): $\lambda_{\max}$ (log ϵ) = 342 nm (3,80); 260 nm (4,15)

5.8.0. 5-Carboxy-nicotinamid-adenin-dinucleotid, red. Form (5-Carboxy-NADH)

Nach der Arbeitsvorschrift aus meiner Diplomarbeit wird das 5-Carboxy-nicotinamid-adenin-dinucleotid (5-Carboxy-NAD) hergestellt. Reduziert wird mit Natriumdithionit analog der Reduktion von 5- α -Ketobutyrat- und 5- α -Hydroxybutyrat-NADH. Die Reinigung erfolgt durch Säulenchromatographie (1,2 x 25 cm)

an einem Anionenaustauscher (Sephadex - A 25, Chloridform). Elution mit Wasser und anschließend mit einem linearen Gradienten aus je 400 ml Wasser und 0,3 M Lithiumchlorid-Lösung. 5-Carboxy-NADH eluiert bei 0,22 M LiCl-Lösung.

UV (Wasser): $\lambda_{\max} (\log \epsilon) = 360 \text{ nm } (3,64); 260 \text{ nm } (4,15)$

5.9.0. Additionsverbindungen von NAD und NAD-Derivaten

Zur Bildung der Cyanid-Additionsverbindung gibt man zu 2,9 ml einer 1 M wässrigen KCN-Lösung 0,1 ml einer 15 mM NAD- bzw. NAD-Derivat-Lösung.

Das Cyanid-Addukt in methanolischer Lösung erhält man, indem man zu 3 ml gesättigte methanolische KCN-Lösung die NAD-Derivate bzw. NAD in fester Form zugibt.

Die Sulfit-Additionsverbindungen bilden sich in einer wässrigen 1 M Natriumhydrogensulfit-Lösung pH = 7,5 bzw. in einer 0,1 M Natriumhydrogensulfit-Lösung für NAD. Zu 2,9 ml dieser Lösung gibt man 0,1 ml einer 15 mM NAD- bzw. NAD-Derivat-Lösung.

Die nur in den entsprechenden Lösungen stabilen Additionsverbindungen ergeben UV-Spektren mit charakteristischen Absorptionsmaxima, die in Abschnitt 2.2.5. Tabelle 3 beschrieben sind.

6.0.0. Analytische Messungen

6.1.0. UV-Spektren

Die UV-Spektren wurden mit einem Beckmann DB Gitterspektrometer (Wellenbereich 200 - 800 nm) aufgenommen.

Zur Messung von Einzelextinktionen diente ein Eppendorf-Photometer mit thermostatisierbaren Küvetten.

Filter: 366, 436, 546 und 578 nm

6.2.0. ^1H -Kernresonanzspektren

Die ^1H -NMR-Spektren wurden an einem Varian 1-60 Gerät aufgenommen. Als Standard diente Tetramethylsilan.

6.3.0. IR-Spektren

Zur Aufnahme der IR-Spektren diente ein Perkin-Elmer 157 Gitterspektrometer. Die Spektren wurden in einem Bereich von 625 - 4000 cm^{-1} aufgenommen.

6.4.0. Elementaranalysen

Die Bestimmung von C, H und N wurde von Frau Baller am Lehrstuhl für Anorganische Chemie II der Abteilung Chemie der Ruhr-Universität durchgeführt.

Die Bestimmung von C, H, N und P vom mikroanalytischen Laboratorium Dornis und Kolbe, Mülheim/Ruhr.

6.5.0. Schmelzpunktbestimmung

Alle Schmelzpunkte wurden in Kapillaren gemessen und sind unkorregiert.

6.6.0. Hochspannungselektrophorese

Elektrophoretische Trennungen wurden auf Whatman No. 3 MM Chromatographiepapier mit einem Pherographen · Original · Frankfurt, Modell 64 durchgeführt.

Puffer: 0,1 M Ammoniumacetat-Puffer pH = 4,6 (85)

Spannung: 700 V

Stromstärke: 35 mA

Dauer: 3 Stunden

Substanzlokalisierung: UV-Fluoreszenz bei 265 nm und Butan-2-on/ NH_3 -Test auf quartäre Pyridinium-Derivate (33) wie in Abschnitt 6.9.0. beschrieben.

6.7.0. Dünnschichtchromatographie

Für die analytischen Trennungen wurden dünnschichtchromatographische Fertigplatten, Kieselgel F 254 mit Fluoreszenzindikator der Firma Merk verwendet (5 x 20 cm; 20 x 20 cm).

Schichtdicke: 0,25 mm

Laufmittel:

LM A) Isobuttersäure/konz. $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ (66 : 1 : 33) pH = 4 (86)

LM B) 1 M Ammoniumacetat/95 ~~gig~~ Äthanol (1 : 1) pH = 6 (86)

LM C) Propanol/konz. $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ (20 : 12 : 3) pH = 8 (87)

LM D) Pyridin/Essigsäure/ H_2O /Butanol (40 : 14 : 25 : 68) (88)

Laufzeit: 3 - 5 Stunden

Substanz-Lokalisierung: UV-Absorption 265 nm, Fluoreszenz-Lokalisierung 330 nm, Butan-2-on/ NH_3 -Test.

6.8.0. Säulenchromatographie

Für analytische und präparative säulenchromatographische Trennungen wurde als Säulenmaterial DEAE-Sephadex - A 25 der Firma Pharmacia verwendet. Dieser schwach basische Anionenaustauscher trägt an einer Dextranmatrix als funktionelle Gruppen Diäthylaminoäthyl-Reste mit Chlorid als Gegenion (89). Wird der Austauscher in der Formiat- oder Acetatform benötigt, so quillt man ihn statt in Wasser in einer 0,5 M Lösung aus Natriumformiat bzw. Ammoniumacetat und wäscht anschließend mehrmals mit der jeweiligen Salzlösung, bis im Überstand keine Chlorid-Ionen mehr nachzuweisen sind. Danach wird noch gründlich mit Wasser gewaschen, um überschüssige Salze zu entfernen.

Die bei 254 nm absorbierenden Fraktionen wurden mit einem LKB-Uvicord erkannt und mit einem LKB-Fraktionssammler aufgefangen.

6.9.0. Test auf quartäre Pyridinium-Verbindungen (33)

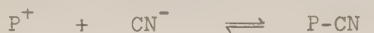
Die getrockneten Platten bzw. Papierstreifen wurden eine Stunde lang in einen Exikkator über einer Mischung aus Butan-2-on und konz. Ammoniak (1 : 1) gelagert. Die sich bildenden Butanon-Additionsverbindungen der quartären Pyridiniumverbindungen lassen sich bei Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge 330 nm an ihrer intensiven blau-weißen Fluoreszenz erkennen.

6.10.0. Nachweis auf Aminosäuren mit Ninhydrin

Die getrockneten Platten wurden mit einer Sprühlösung aus 0,2 g Ninhydrin in 100 ml Äthanol gut befeuchtet und anschließend bis zur optimalen Farbentwicklung der Flecken auf 110 °C erwärmt (90).

6.11.0. Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten der CN-Addition nach Wallenfels (37)

0,1 ml einer etwa 10^{-4} M Lösung des Pyridiniumsalzes in Wasser wurden in eine Küvette (Volumen = 3 ml, d = 1 cm) pipettiert und 2,9 ml einer KCN-Lösung zugesetzt, deren Konzentration so bemessen ist, daß das Pyridiniumsalz vollständig in die Additionsverbindung überführt wird (ca. 1 M KCN). Das Spektrum dieser Lösung wurde im UV-Spektrometer aufgenommen, wobei als Vergleichslösung eine Mischung aus 0,1 ml Wasser und 2,9 ml KCN-Lösung der gleichen Konzentration diente. Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten der Absorptions-Bande bei 328 nm ließ sich die Ausgangskonzentration der Pyridiniumsalz-Lösung bestimmen. Bei geringeren KCN-Konzentrationen stellte sich das Gleichgewicht der CN-Addition



entsprechend ein. Sowohl aus der Höhe der langwelligen Bande als auch aus der Abnahme der bei 360 nm liegenden Bande ließ sich das Verhältnis $[P-CN] : [P^+]$ bestimmen. Die Aktivität der Cyanid-Ionen wurde unter Berücksichtigung der Hydrolyse- und Säurekonstante der Blausäure, sowie des Aktivitätskoeffizienten der KCN-Lösung errechnet (91). Bei Konzentrationen von $< 10^{-2}$ M wurde in 0,05 M Tris-Puffer pH = 8,5 gearbeitet.

7.0.0. Enzymatische Messungen

7.1.0. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen wurden bestimmt entweder durch Messung der Absorption bei 280 nm in Phosphat-Puffer oder mit der Biuret-Methode (97) in Mikro-Form:

2,5 - x ml H₂O
x ml Proteinlösung (0,3 - 0,6 mg Protein)
2,5 ml Biuret-Reagenz

Messung der Extinktion bei 546 nm nach 30 Minuten in einer 2-cm-Küvette im Eppendorf-Photometer gegen einen Blindwert ohne Protein.

Proteinkonzentration:

$$c \text{ (mg/ml)} = \frac{E \cdot 8,3}{x \text{ ml}}$$

7.2.0. Messung der spezifischen Aktivität verschiedener Dehydrogenasen

Die in gesättigter Ammoniumsulfat-Lösung kristallin vorliegenden Dehydrogenasen wurden gegen einen 0,067 M Phosphat-Puffer pH = 7,2 über Nacht dialysiert. Unlösliche Bestandteile bei 40.000 g abzentrifugiert. Die spezifische Aktivität der Enzyme bestimmte man in Thermoküvetten (Schichtdicke 1 cm; Volumen 3 ml) bei 25 °C über die Anfangssteigung der Extinktionsänderung bei 366 nm in einem Eppendorf-Photometer. Der Extinktionskoeffizient ist $\epsilon = 3,33 \times 10^3 \text{ Mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Die spezifische Aktivität ist definiert:

$$\text{Units/mg} = \frac{\mu\text{Mol umgesetzttes Substrat}}{\text{min} \times \text{mg Enzym eingesetzt}}$$

7.2.1. Spezifische Aktivität der Alanin-DH

0,5 mM NAD werden von 15,7 mM L-Alanin in 60 mM Carbonat-Puffer pH = 10 durch eine entsprechend verdünnte Probe der L-Alanin-DH reduziert (92). Den Proteinwert bestimmt man spektroskopisch über den Extinktionswert bei 280 nm. $A_{280}^{1\%} = 6,4$

Spezifische Aktivität: 30 U/mg

7.2.2. Spezifische Aktivität der ADH

In einem Puffer aus 85,5 mM Natrium-Pyrophosphat und 19,1 mM Glycin pH = 9 werden in Gegenwart von 6,2 mM Semicarbazid-Hydrochlorid und 1 mM Gluthation 2,0 mM NAD mit 0,6 mM Äthanol und einer entsprechend verdünnten Probe ADH reduziert (93). Den Proteinwert bestimmt man spektroskopisch über die Extinktionswerte.

$$A_{280}^{0,1\%} = 0,42 \quad \text{für ADH aus Pferdeleber (94)}$$

$$A_{280}^{0,1\%} = 1,26 \quad \text{für ADH aus Hefe (95)}$$

Spezifische Aktivität: 286 U/mg für ADH aus Hefe
2,8 U/mg für ADH aus Pferdeleber

7.2.3. Spezifische Aktivität der GAP-DH

Die Testmischung enthält 82,3 mM Tris-äthanolamin-Puffer pH = 7,6, 1,1 mM ATP, 6,2 mM Glycerat-3-Phosphat, 0,2 mM NADH, 0,9 mM EDTA, 2 mM MgSO_4 und ca. 40 U 3-Phosphoglyceratkinase. Gestartet wird die Reaktion mit einer entsprechend verdünnten Probe der GAP-DH (99). Proteinwert-Bestimmung nach der Biuret-Methode.

Spezifische Aktivität: 78 U/mg

7.2.4. Spezifische Aktivität der Glycerat-DH

0,4 mM NADH werden von 0,85 mM Hydroxypyruvat mit einer entsprechend verdünnten Probe der Glycerat-DH in 67 mM Tris-HCl-Puffer pH = 7 oxydiert (96). Proteinwert-Bestimmung nach der Biuret-Methode.

Spezifische Aktivität: 126 U/mg

7.2.5. Spezifische Aktivität der Glycerin-DH

0,177 mM NAD werden in einem 33 mM Pyrophosphat-Puffer pH = 8,8 von 0,17 M Glycerin mit einer entsprechend verdünnten Probe der Glycerin-DH reduziert (98). Proteinwertbestimmung durch Auswaage und Reinheitsangabe des Herstellers.

Spezifische Aktivität: 4,9 U/mg

7.2.6. Spezifische Aktivität der LDH und D-LDH

0,44 mM NADH werden von 0,5 mM Natriumpyruvat in 67 mM Phosphat-Puffer pH = 7,2 von einer entsprechend verdünnten Probe LDH oder D-LDH oxydiert. Der Proteinwert der LDH wurde spektroskopisch ermittelt;

$$A_{280}^{0,1\%} = 1,35 \quad (100)$$

den Proteinwert der D-LDH bestimmt man nach der Biuret-Methode. Für den Aktivitätstest der LDH aus Schweinemuskel werden statt 0,5 mM Pyruvat 2 mM Pyruvat eingesetzt.

Spezifische Aktivität: 423 U/mg	LDH aus Schweineherz
532 U/mg	LDH aus Schweinemuskel
302 U/mg	D-LDH aus Lactobacillus leichm.

7.2.7. Spezifische Aktivität der MDH

0,42 mM NADH werden von 0,5 mM Oxalessigsäure in 67 mM Phosphat-Puffer pH = 7,2 in Gegenwart von einer entsprechend verdünnten Probe MDH oxydiert (101). Den Proteinwert erhält man über den Extinktionswert:

$$A_{280}^{0,1\%} = 0,27 \quad (102)$$

Spezifische Aktivität: 770 U/mg

7.3.0. Spezifische Aktivität der NAD-Glycohydrolase

Die käufliche NAD-Glycohydrolase erhält man als Wasser unlösliches Aceton-Trockenpulver. Die spezifische Aktivität dieses Präparates beträgt 7 U/mg bei 37 °C mit NAD als Substrat gemessen. Für alle enzymatischen Messungen wurde die NAD-Glycohydrolase zuvor mit Ultraschall behandelt, wodurch die Aktivität des Enzyms auf das 40fache der Anfangsaktivität ansteigt (103).

Zu Ultraschall-Behandlung werden 0,834 g NAD-Glycohydrolase in 20 ml 0,1 M Phosphat-Puffer pH = 7 suspendiert. Diese Suspension wird unter Kühlung auf 0°C (im Eis-Kochsalzbad) fünfmal jeweils eine Minute mit 20 KHz / 90 W behandelt. Die Aktivität der NAD-Glycohydrolase wurde nach der Ultraschall-Behandlung mit Hilfe der Kaplanschen Cyanid-Methode bestimmt (104):

0,2 ml der aktivierten Enzymlösung werden mit 0,1 ml NAD-Lösung (7,45 mg/2ml) und 0,3 ml 0,1 M Phosphat-Puffer pH = 7,5 bei 37 °C inkubiert. Nach 8 Minuten stoppt man die Hydrolyse durch Zugabe von 3 ml 1 M KCN-Lösung und zentrifugiert 10 Minuten bei 20.000 g. Die Extinktion der klaren Lösung wird bei 315 nm gemessen. Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten des Cyanid-Addukts ($\epsilon_{315} = 4,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) läßt sich die nicht hydrolysierte NAD-Menge berechnen und damit die Menge des durch die NAD-Glycohydrolase gespaltenen NAD's.

7.4.0. Hemmung der enzymatischen Oxydation bzw. Reduktion durch die NAD- und NADH-Derivate

Auf ihre Eigenschaft als Hemmstoff wurden folgende Verbindungen untersucht:

5- α -Ketobutyrat-NAD und -NADH, 5- α -Hydroxybutyrat-NAD und -NADH und 5-Carboxy-NAD und -NADH

Zur Ermittlung der prozentualen Hemmung der enzymatischen Oxydation von NADH bzw. Reduktion von NAD wurde die Geschwindigkeit der Umsetzung mit und ohne Hemmstoff in einem Eppendorf-Photometer bei 366 nm gemessen. (Küvetten: 1 cm Schichtdicke; 0,5 ml Volumen; thermostatisiert auf 25 °C)

Die Konzentration der NAD-Derivate im Testansatz war für alle Untersuchungen 0,44 mM und 4,4 mM, die der NADH-Derivate 0,044 mM und 0,44 mM.

7.4.1. Hemmung der enzymatischen Oxydation

A) Die Testmischung für die Alanin-DH besteht aus:

0,365 ml 50 mM Tris-HCl-Puffer pH = 8,0
bzw. 0,365 - x ml Hemmstoff
0,050 ml Na-Pyruvat-Lösung (100 mM)
0,025 ml NH_4Cl -Lösung (3 M)
0,050 ml NADH-Lösung (4,4 mM)

Gestartet wird die Reaktion mit 0,01 ml L-Alanin-DH-Lösung (ca. 0,08 mg/ml Protein).

B) Die Testmischung für die ADH besteht aus:

0,390 ml 67 mM Phosphat-Puffer pH = 7,2
bzw. 0,390 - x ml Hemmstoff
0,050 ml NADH-Lösung (4,4 mM)
0,050 ml Acetaldehyd-Lösung (1 M)

Gestartet wird die Reaktion mit 0,01 ml ADH (aus Pferdeleber ca. 0,3 mg/ml Protein; aus Hefe ca. 0,01 mg/ml Protein).

C) Die Testmischung für die GAP-DH besteht aus:

- 0,36 ml 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH 7,2
- bzw. 0,36 - x ml Hemmstoff
- 0,02 ml ATP-Lösung (27,5 mM)
- 0,03 ml Glycerat-3-Phosphat-Lösung (103,3 mM)
- 0,05 ml NADH-Lösung (4,4 mM)
- 0,01 ml EDTA-Lösung (10 mM)
- 0,01 ml MgSO_4 -Lösung (45 mM)
- 0,01 ml PGK-Lösung (ca. 650 U)

Gestartet wird die Reaktion mit 0,01 ml GAP-DH-Lösung (ca. 0,01 mg/ml Protein).

D) Die Testmischung für die Glycerat-DH besteht aus:

- 0,39 ml 67 mM Phosphat-Puffer pH = 7,2
- bzw. 0,39 ml - x ml Hemmstoff
- 0,05 ml NADH-Lösung (4,4 mM)
- 0,05 ml Hydroxypyruvat-Lösung (8,5 mM)

Gestartet wird die Reaktion mit 0,01 ml Glycerat-DH-Lösung (ca. 0,1 mg/ml Protein).

E) Die Testmischung für die LDH und D-LDH besteht aus:

- 0,43 ml 67 mM Phosphat-Puffer pH = 7,2
- bzw. 0,43 ml - x ml Hemmstoff
- 0,05 ml NADH-Lösung (4,4 ml)
- 0,01 ml Na-Pyruvat-Lösung (25 mM)

Gestartet wird die Reaktion mit 0,01 ml LDH-Lösung bzw. 0,01 ml D-LDH-Lösung (ca. 0,02 mg/ml Protein).

F) Die Testmischung für die MDH besteht aus:

- 0,39 ml 67 mM Phosphat-Puffer pH = 7,2
- bzw. 0,39 ml - x ml Hemmstoff
- 0,05 ml NADH-Lösung (4,4 mM)
- 0,05 ml Oxalacetat-Lösung (5 mM)

Gestartet wird die Reaktion mit 0,01 ml MDH-Lösung (ca. 0,02 mg/ml Protein).

7.4.1. Hemmung der enzymatischen Reduktion

A) Die Testmischung für die ADH besteht aus:

- 0,39 ml 0,1 M Tris-HCl-Puffer pH = 10
- bzw. 0,39 ml - x ml Hemmstoff
- 0,05 ml Äthanol-Lösung (3 M)
- 0,05 ml NAD-Lösung (19,3 mM)

Gestartet wird die Reaktion mit 0,01 ml ADH-Lösung
(aus Pferdeleber ca. 1 mg/ml Protein;
aus Hefe ca. 0,15 mg/ml Protein).

B) Die Testmischung für die LDH besteht aus:

- 0,39 ml 0,1 M Glycin-NaOH-Puffer pH = 9,5
- bzw. 0,39 ml - x ml Hemmstoff
- 0,05 ml NAD-Lösung (19,5 mM)
- 0,05 ml L-Lactat-Lösung (0,625 M)

Gestartet wird die Reaktion mit 0,01 ml LDH-Lösung
(ca. 0,25 mg/ml Protein).

C) Die Testmischung für die D-LDH besteht aus:

- 0,39 ml 0,1 M Glycin-NaOH-Puffer pH = 9,5
- bzw. 0,39 - x ml Hemmstoff
- 0,05 ml NAD-Lösung (19,5 mM)
- 0,05 ml D-Lactat-Lösung (0,625 M)

Gestartet wird die Reaktion mit 0,01 ml D-LDH-Lösung
(ca. 0,24 mg/ml Protein).

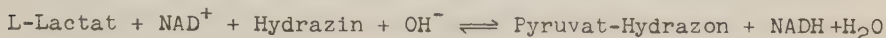
D) Die Testmischung der MDH besteht aus:

- 0,39 ml 0,1 M Glycin-NaOH-Puffer pH = 9,5
- bzw. 0,39 ml - x ml Hemmstoff
- 0,05 ml NAD-Lösung (19,5 M)
- 0,05 ml Malat-Lösung (0,634 M)

Gestartet wird die Reaktion mit 0,01 ml MDH
(ca. 0,2 mg/ml Protein).

7.5.0. Enzymatische Bestimmung von Lactat mit LDH und NAD (105)

Um eine vollständige Oxydation des Lactats zu erreichen, werden die bei der Reaktion entstehenden Produkte abgefangen, und zwar die Protonen durch ein alkalisches Reaktionsmedium und das Pyruvat durch Reaktion mit Hydrazin zum Hydrazon.



0,45 ml Hydrazin-Glycin-Puffer pH = 9,5
(enthält 0,4 M Hyrazin, 1 M Glycin und 5,3 mM EDTA)
0,05 ml NAD-Lösung (48,2 mM)
0,10 ml Lactat-Probe
0,40 ml Wasser

Gemessen wird die Extinktion bei 366 nm vor LDH-Zugabe (E_1) und nach Zugabe von ca. 18 U LDH, nachdem sich ein konstanter Endwert eingestellt hat (E_2). Aus der Differenz $E_2 - E_1$ läßt sich über den Extinktionskoeffizienten von NADH (ϵ_{366} $3,33 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) die Lactat-Konzentration bestimmen.

7.6.0. Bestimmung der K_M -, K_I - und $V_{\max}$ -Werte

Es wird die Anfangsgeschwindigkeit der enzymatisch katalysierten Reaktionen in Abhängigkeit von der Substrat- bzw. Coenzymkonzentration gemessen. Die Substrat- bzw. Coenzymkonzentrationen werden so gewählt, daß sie unterhalb der Sättigungskonzentration liegen. Die K_M -, K_I - und $V_{\max}$ -Werte erhält man, wenn man die reziproken Werte der Anfangsgeschwindigkeit gegen die reziproken Substratkonzentrationen nach Lineweaver-Burk (43) aufträgt. Die Messungen werden bei 25 °C in 1 cm Thermoküvetten ausgeführt. Die Extinktion wird bei 366 nm in einem Eppendorf-Photometer mit angeschlossenem Schreiber gemessen. Gestartet wird die Reaktion durch Zugabe der Enzymmenge. Die Konzentrationsangaben sind in den jeweiligen Abschnitten unter den Auswertungsdiagrammen aufgeführt.

7.7.0. Fluoreszenztitration zur Untersuchung von binären Enzym:Coenzym-Komplexen

Mit Hilfe der Fluoreszenztitration läßt sich das Coenzym-Bindungsvermögen von Enzymen sowie die Dissoziationskonstante des binären Komplexes berechnen. Analog den Arbeiten mit NADH als Coenzym wurden die Versuche mit 5-Carboxy-NADH durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgten an einem MPE - 2A Fluoreszenz-Spektrometer der Fa. Hitachi, Ltd., Tokio, bei 25 °C.

Die Anregungswellenlänge beträgt 360 nm, die Emissionswellenlänge 440 nm. In den folgenden 4 Ansätzen wird die Intensitätszunahme der 5-Carboxy-NADH-Fluoreszenz bei der Titration mit steigenden Mengen 5-Carboxy-NADH gemessen.

- a) 2 ml 67 mM Phosphat-Puffer pH 7,2 (5-Carboxy-NADH-Blindw.)
- b) 0,6 mg LDH H₄ in 2 ml Phosphat-Puffer pH 7,2
- c) 0,87 mg MDH in 2 ml Phosphat-Puffer pH 7,2
- d) 0,84 mg ADH (Pferdeleber) in 2 ml Phosphat-Puffer pH 7,2

Die 5-Carboxy-NADH-Zugabe erfolgt zu Beginn der Titration in 5 μ l - und später in 10 μ l-Aliquoten einer ungefähr 0,7 mM Stammlösung (der genaue Gehalt wird spektroskopisch bestimmt). Die Differenz der Intensität zwischen dem 5-Carboxy-NADH-Blindwert und dem entsprechenden Enzym:5-Carboxy-NADH-Wert wird gegen die jeweilige 5-Carboxy-NADH-Konzentration aufgetragen. Man erhält die Dissoziationskurve für den Enzym:Coenzym-Komplex. Mit dem aus der Dissoziationskurve erhaltenen Endwert der Fluoreszenzerhöhung ($F_{\max}$) bei Absättigung aller Coenzym-Bindungsstellen läßt sich die Dissoziations-Konstante K_D berechnen:

$$K_D = \left(1 - n \frac{E_b}{L_{\text{tot}}} \right) \cdot \frac{L_{\text{tot}} \cdot E_{\text{frei}}}{E_b}$$

Die Gleichung gilt für ein Bindungsvermögen von 1 Mol 5-Carboxy-NADH/Mol Enzymuntereinheit und setzt voraus, daß 5-Carboxy-NADH von jeder Untereinheit mit der gleichen K_D gebunden wird. Der Quotient $F/F_{\max}$ bezeichnet das Verhältnis der bei einer bestimmten 5-Carboxy-NADH-Konzentration vorliegenden Fluoreszenzintensität zur Fluoreszenzintensität des Endwertes. Er nimmt den Wert 1 an, wenn alle Enzymuntereinheiten mit dem Coenzym abgesättigt sind.

Die Auswertung der Messung erfolgt graphisch nach der von Scatchard (106) entwickelten Methode durch Auftrag von E_b/L_{tot} (x-Achse) gegen $E_b/L_{\text{tot}} \times E_{\text{frei}}$ (y-Achse). Der Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse gibt die Zahl der Bindungsstellen, der mit der y-Achse $1/K_D$ an.

7.8.0. Untersuchungen zur Bildung von ternären Komplexen

7.8.1. Ternärer LDH: Coenzym(red.):Oxamat-Komplex

Bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm wird das Fluoreszenzspektrum des binären LDH:Coenzym(red.)-Komplexes zwischen 370 und 520 nm aufgenommen. (MPE - 2A Fluoreszenzspektrometer)
Ist zusätzlich Oxamat in der Testmischung, so macht sich die Bildung des ternären Komplexes durch eine Abnahme der Fluoreszenzintensität bei 440 nm bemerkbar (83).

Konzentrationen im Test:

$8,78 \times 10^{-6}$ M LDH (MG 36000)
 $7,05 \times 10^{-6}$ M 5-Carboxy-NADH bzw. NADH
 $25,0 \times 10^{-6}$ M Oxamat
in 67 mM Phosphat-Puffer pH 7,2

7.8.2. Ternärer ADH:Coenzym(red.):Acetamid-Komplex

Analog zum ternären LDH-Komplex kann man die Bildung des ternären ADH:Coenzym(red.):Acetamid-Komplexes durch eine Erhöhung

der Fluoreszenzintensität gegenüber dem binären Komplex erkennen (84). Konzentrationen im Test:

11 x 10⁻⁶ M ADH (Pferdeleber MG 42000)
14,4 x 10⁻⁶ M 5-Carboxy-NADH bzw. NADH
0,5 M Acetamid
in 67 mM Phosphat-Puffer pH 7,2

7.8.3. Ternärer LDH: Coenzym(oxy.):Sulfit-Komplex

Pfleider und Mitarbeiter (52) fanden, daß Sulfit in Gegenwart von LDH bereits bei Konzentrationen an NAD addiert wird, bei denen ohne Enzym noch keine Addition im UV-Spektrum zu erkennen ist. Dieser ternäre LDH:Coenzym(oxy.):Sulfit-Komplex zeigt das gleiche Absorptionsmaximum wie die enzymfreie Coenzym-Sulfit-Additionsverbindung bei 320 nm. Analoge Messungen wurden mit 5-Carboxy-NAD durchgeführt.

Konzentrationen im Test:

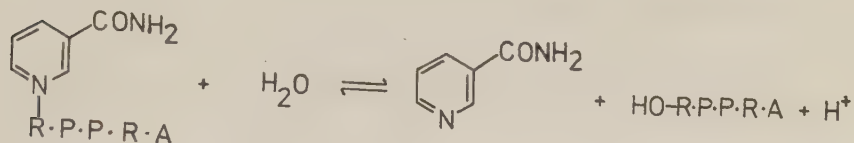
0,484 x 10⁻⁴ M NAD bzw. 5-Carboxy-NAD
4,00 x 10⁻⁴ M Natriumsulfit
9,5 x 10⁻⁶ M LDH (MG: 36000)
in 67 mM Phosphat-Puffer pH 7,2

7.9.0. Enzymatische Hydrolyse von NAD-Derivaten mit der NAD-Glycohydrolase (28)

Hierzu wird die NAD-Glycohydrolase aus Schweinehirn wie bereits in Abschnitt 7.3.0. beschrieben aktiviert. Zu 5 x 10⁻³ Molen NAD-Derivat werden 0,1 g aktivierte NAD-Glycohydrolase und 20 ml 0,1 M Phosphat-Puffer pH 7,2 gegeben. Man inkubiert 2 Stunden bei 37 °C im Schüttelbad. Anschließend wird mit TCA-Lösung das Protein gefällt und bei 40.000 g abzentrifugiert. Die im Überstand befindlichen Nicotinamid-Derivate können

säulenchromatisch (Sephadex - A 25) gereinigt werden.

Die Reaktionsgleichung der enzymatischen Hydrolyse von NAD und NAD-Derivaten mit der NAD-Glycohydrolase lautet:



8.0.0. Bezugsquellen der Enzyme

Firma Boehringer, Mannheim GmbH:

L-Alanin-Dehydrogenase aus Bac.-subtilis	EC 1.4.1.1
Alcohol-Dehydrogenase aus Pferdeleber	EC 1.1.1.1
Alcohol-Dehydrogenase aus Hefe	EC 1.1.1.1
Lactat-Dehydrogenase aus Schweineherz	EC 1.1.1.27
Lactat-Dehydrogenase aus Schweinemuskel	EC 1.1.1.27
D-Lactat-Dehydrogenase aus Lactobac.leichmannii	EC 1.1.1.28
Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel	EC 1.2.1.12
L-Malat-Dehydrogenase aus Schweineherz (mitoch.)	EC 1.1.1.37
3-Phosphorglycerat-Kinase aus Hefe	EC 2.7.2.3
NAD-Glycohydrolase aus Schweinehirn	EC 3.2.2.5

Firma Siga Chemie, München GmbH:

Glycerat-Dehydrogenase aus Spinatblättern	EC 1.1.1.29
Glycerin-Dehydrogenase aus Acrobact. aerogenes	EC 1.1.1.6

9.O.O. Literaturverzeichnis

- 1) H.F. FISCHER, F.H. WESTHEIMER, E.E. CONN, B. VENNESLAND
J. Amer. Chem. Soc. 73, 2403, (1951)
- 2) F. FISCHER, B. VENNESLAND, F.H. WESTHEIMER
J. Biol. Chem. 202, 687, (1953)
- 3) H.R. LEVY, B. VENNESLAND
J. Biol. Chem. 228, 85 (1957)
- 4) N.O. OPPENHEIMER, L.J. ARNOLD, N.O. KAPLAN
Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 3200, (1971)
- 5) R.H. SARMA, R.J. MYNOTT,
J. Amer. Chem. Soc. 95, 7470, (1973)
- 6) K. CHANDRASEKHAR, A. MC PHERSON, M.J. ADAMS, M.G. ROSSMANN
J. Mol. Bioch. 76, 503, (1973)
- 7) M.G. ROSSMANN, A. LILJAS, C.-I. BRÄNDÉN, L.J. BANASZKÉ
in „The Enzymes“ Vol XI Academic Press, New York 1975 S. 61
- 8) M.J. ADAMS, M. BUEHNER, K. CHANDRASEKHAR, G.C. FORD, M.L.
HACKERT, A. LILJAS, M.G. ROSSMANN, I.E. SMILEY, W.S. ALLISON,
J. EVERSE, N.O. KAPLAN, S.S. TAYLOR
Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 1968, (1973)
- 9) M.J. ADAMS, G.C. FORD, R. KOEKOEK, P.J. LENTZ, A. MC PHERSON
M.G. ROSSMANN, J.E. SMILEY, R.W. SCHERITZ, A.J. WONACOTT,
Nature, 227, 1098, (1970)
- 10) C. WOENCKHAUS, J. BERGHÄUSER, G. PFLEIDERER,
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350, 473, (1969)
- 11) J. BERGHÄUSER, I. FALDERBAUM, C. WOENCKHAUS,
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 52, (1971)
- 12) J.D. SHORE, H. GUTFREUND,
Biochemistry, 9, 4665, (1970)
- 13) J. SÜDI,
Biochem. J. 139, 261, (1974)

- 14) J.F. BIELLMANN, J.P. SAMANA
FEBS Letters 38, 175, (1974)
- 15) N.O. KAPLAN, M.M. CIOTTI
J. Biol. Chem. 221, 823, (1956)
- 16) N.O. KAPLAN, M.M. CIOTTI, F.E. STOLZENBERG
J. Biol. Chem. 221, 833, (1956)
- 17) S.S. HIXSON, S.H. HIXSON
Photochem. Photobiol. 18, 135, (1973)
- 18) N.O. KAPLAN, M.M. CIOTTI
J. Amer. Chem. Soc. 76, 1713, (1954)
- 19) A. BALLIO, G. SERLUPI-CRESCENZI
Nature 180, 1203, (1957)
- 20) B.M. ANDERSON, C.J. CIOTTI, N.O. KAPLAN
J. Biol. Chem. 234, 1219, (1959)
- 21) P. WALTER, N.O. KAPLAN
J. Biol. Chem. 238, 2823, (1963)
- 22) W.E. TROMMER, H. KAPMEYER, G. PFLEIDERER
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 101, (1975)
- 23) H. BLUME
Dissertationsarbeit Abt. Chemie an der Ruhr-Univ. Bochum 1975
- 24) W. HANSTEIN, K. WALLENFELS
Tetrahedron 23, 585, (1967)
- 25) E.B. REID, J.R. SIEGEL
J. Chem. Soc. 1954, 520
- 26) H. KAPMEYER-NALIK
Diplomarbeit, Abt. Chemie an der Ruhr-Univ. Bochum 1973
- 27) M. LAMBORG, F.E. STOLZENBACH, N.O. KAPLAN
J. Biol. Chem. 231, 683, (1958)
- 28) N.O. KAPLAN, M.M. CIOTTI, J. EYS, R.M. BURTON
J. Biol. Chem. 234, 134, (1958)
- 29) S. GUTCHO, E.D. STEWART
Anal. Chem. 20, 1185, (1948)

- 30) C.P. FAWCETT, M.M. CIOTTI, N.O. KAPLAN
Biochem. Biophys. Acta 54, 210, (1961)
- 31) J. F. BIELLMANN, J.P. SAMAMA, A.D. WRIXON
Biochimie 55, 1469, (1973)
- 32) E. SILVERSTEIN
Anal. Biochim. 12, 199, (1965)
- 33) E. KODICEK, K.K. REDDI
Nature 168, 472, (1951)
- 34) O. MEYERHOF, P. OHLMEYER, W. MOHLE
Biochem. Z. 297, 113, (1938)
- 35) K. Burton, T.H. WILSON
Biochem. J. 54, 86, (1953)
- 36) F.L. RODKEY
J. Biol. Chem. 213, 777, (1955)
- 37) K. WALLENFELS, H. DIEKMANN
Liebigs Ann. Chem. 621, 166, (1959)
- 38) R. CZOK, T. BÜCHNER
Adv. Prot. Chem. 15, 364, (1960)
- 39) J. EVERS, N.O. KAPLAN
in „Adv. Enzymol.“ Band 37, S. 89, (1973)
- 40) A. MEISTER
J. Biol. Chem. 197, 309, (1952)
- 41) E.H. EISMANN, H.A. LEE, A.D. WINER
Biochemistry 4, 606, (1965)
- 42) J.J. HOLBROOK, R.A. STINSON
Biochem. J. 131, 739, (1973)
- 43) H. LINEWEAVER, D. BURK
J. Amer. Chem. Soc. 56, 658, (1934)
- 44) L. MICHAELIS, M.L. MENTEN
Biochemische Z. 49, 333, (1919)
- 45) J. EVERSE, E.C. ZOLL, L. KAHAN, N.O. KAPLAN
Bioorg. Chem. 1, 207, (1971)

- 46) C. WOENCKHAUS, G. PFLEIDERER
Biochem. Z. 341, 495, (1965)
- 47) C. WOENCKHAUS, M.H. VOLZ
Chem. Ber. 99, 1712, (1966)
- 48) J.F. BIELLMANN, C.G. HIRTH, M.J. JUNG, N. ROSENHEIMER
Eur. J. Biochem. 41, 517, (1974)
- 49) K. WALLENFELS, H. SUND, A. FAESSLER, W. BURCHARD
Biochem. Z. 329, 31, (1957)
- 50) H. AKESON
Biochem. Biophys. Res. Commun. 17, 211, (1964)
- 51) H.L. HACKERT, M.J. ADAMS, M. BUENER, K. CHANDRAEKHAR,
G.C. FORD, P.J. LENTZ, A. LILIAS, S.T. RAO, M.G. ROSSMANN
I.E. SMILEY, J.L. WHITE
Tagungsbericht
- 52) G. PFLEIDERER, D. JECKEL, TH. WIELAND
Biochem. Z. 328, 187, (1956)
- 53) J.W. CORNFORTH, G. RYBACK, G.P. POPJAK, C. DONNINGER,
G. SCHROEFER
Biochim. Biophys. Res. Com. 9, 371, (1962)
- 54) J.W. CORNFORTH, C. DONNINGER, G.P. POPJAK, G. RYBACK,
G. SCHROEPFER
Proc. Roy. Soc. Ser. B, 163, (1965/66)
- 55) J. OHLSSON, B. NORDSTRÖM, C.-I. BRÄNDEN
J. Mol. Biol. 89, 339, (1973)
- 56) C.J. BRÄNDEN, H. JÖRNVALL, H. EKLUND, B. FURUGREN
in "The Enzyms", Acad. Press, 1975, S. 103
- 57) E. ZEPPEZAUER, H. JÖRNVALL, I. OHLSSON
Eur. J. Biochem. 58, 95, (1975)
- 58) G. PFLEIDERER, C. WOENCKHAUS, M. NELBÖCK-HOCHSTETER
Liebigs Ann. Chem. 690, 120, (1965)
- 59) K. WALLENFELS, H. DIEKMANN
in "Hoppe-Seyler-Thierfelder" Bd.VI, Springer Verl. (1966)

- 60) N.J. OPPENHEIMER, N.O. KAPLAN
Biochemistry 13, 4675, (1974)
- 61) N.O. OPPENHEIMER, N.O. KAPLAN
Arch. Biochem. Biophys. 166, 526, (1975)
- 62) C. WOENCKHAUS, P. ZUMP
Biochem. Z. 343, 326, (1965)
- 63) G. DE LA HABA, J.G. LEDER, E. RACKER
J. Biol. Chem. 214, 409, (1955)
- 64) A. MEISTER
J. Biol.Chem. 184, 117, (1950)
- 65) J.J. HOLBROOK
Biochem. J. 133, 847, (1973)
- 66) D.DENNIS
in "Methods in enzymology" Vol.5, Acad. Press (1955), S.430
- 67) H.B. LEJOHN
J. Biol. Chem., 246, 2116, (1971)
- 68) D.DENNIS, N.O. KAPLAN
Fed. Proc. 18, 213, (1959)
- 69) E.M. TARMEY, N.O. KAPLAN
J. Biol. Chem. 243, 2579, (1968)
- 70) D. DENNIS, N.O. KAPLAN
J. Biol. Chem. 235, 810, (1960)
- 71) A. YOSHIDA, E. FREESE
Biochem. Biophys. Acta 92, 33, (1964)
- 72) A. PIERARD, J.M. WIAME
Biochem. Biophys. Acta 37, 490, (1960)
- 73) S. GOLDMAN
Biochem. Biophys. Acta 34, 527, (1959)
- 74) H. KRÖNKE
Staatsexamensarbeit an der Ruhr-Univ. Bochum, Abt.Chemie (1976)
- 75) E. HILL, D. TSERNOGLOU, L. WEBB, L.J. BANASZAK
J. Mol. Biol. 72, 577, (1972)

- 76) L. WEBB, E. HILL, L.J. BANASZAK
Biochemistry 12, 5101, (1973)
- 77) C.-I. BRÄNDEN, H. EKLUND, B. NORDSTRÖM, T. BOIWE, G. SÖDERLUND
E. ZEPPEZAUER, I. OHLSSON, A. AKESON
Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 2439, (1973)
- 78) H. EKLUND, B. NORDSTRÖM, E. ZEPPEZAUER, G. SÖDERLUND,
I. OHLSSON, T. BOIWE, C.-I. BRÄNDEN
Febs Letters, 44, 200, (1974)
- 79) J. EVERS, R.E. BARNETT, C.J. THORNE, N.O. KAPLAN
Arch. Biochem. Biophys. 143, 444, (1971)
- 80) A.D. WINER, G.W. SCHWERT
Biochem. Biophys.. Acta 29, 424, (1958)
- 81) H. THEORELL, T.A. LANGAN
Acta. Chem. Scand. 14, 933, (1960)
- 82) H. THEORELL, A.D. WINER
Arch. Biochem. Biophys. 83, 291, (1959)
- 83) A.D. WINER, G.W. SCHWERT.
J. Biol. Chem. 234, 1155, (1959)
- 84) H. THEORELL, J.S. MC KINLY-MC KEE
Acta Chem. Scan. 15, 1811, (1961)
- 85) R. CLOTTEN, A. CLOTTEN
in "Hochspannungselektrophorese" 1962, S. 62
- 86) N.O. KAPLAN in
in "Methods in Enzymology" Vol. 18 B (1967) 2849
- 87) M. YOSHIKAWA, T. KATO
Bull. Chem. Soc. Jap. 40, 2849, (1967)
- 88) T. WIELAND
Biochem. Z., 340, 476, (1964)
- 89) Broschüre der Pharmacia Chemicals "Sephadex-Ionenaustauscher,
Leitfaden der Ionenaustauschchromatographie" (1970)
- 90) A.R. PATTON, P. CHISM
Anal. Chem. 23, 1683, (1951)

- 91) H.M. RAUEN
in "Biochemisches Taschenbuch" (1956) S. 639
- 92) BOEHRINGER "Biochemica Information" I (1973) S. 36
- 93) H.U. Bergmeyer
in "Methoden der Enzymatischen Analyse" (1970), S. 392
- 94) K. DALZIL
Acta Chem. Scand. 12, 459, (1958)
- 95) J.E. HAYES, S.F. VELICK
J. Biol. Chem. 207, 225, (1954)
- 96) I. ZELICK
J. Biol. Chem. 216, 553, (1955)
- 97) G. BEISENHERZ, H.J. BOLTZE, TH. BÜCHER, R. CZOCK, K.H.
GARBADE, E. MEYER-ARENDT, G.PFLEIDERER
Z. Naturforscher 8b, 555, (1956)
- 98) R.M. BURTON
in "Methods in Enzymology" Vol. I, Acad. Press, S.397, (1955)
- 99) BOEHRINGER "Biochemical Analyse" I (1973), S. 105
- 100) G.PLEIDERER, D. JECKEL,
Biochem. Z. 329, 370, (1957)
- 101) H.U. BERGMAYER
in "Methoden der Enzymatischen Analyse" I (1970), S. 446
- 102) J.J. HOLBROOK, R.G. WOLFE
Biochemistry 11, 2499, (1972)
- 103) D.T. BROWNE, S.S. HIXSON, F.H. WESTHEIMER
J. Biol. Chem. 246, 4477, (1971)
- 104) N.O. KAPLAN
in "Methods in Enzymology" Vol II, (1955) S. 660
- 105) H.U. BERGMAYER
in "Methoden der Enzymatischen Analyse" II, (1970), S.1425
- 106) G. SCATCHARD
Ann. N. Y. Acad. Sci. 51, 660 (1949)

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Geboren am 27.12.47 als Tochter des Arbeiters Wilhelm Nalik und seiner Ehefrau, geb Janke in Fallingbostel.

Verheiratet seit dem 30.11.73 mit dem Diplom-Chemiker Wolfgang Kapmeyer.

Schulische Ausbildung:

1954 Einschulung in die Volksschule Fallingbostel.

1958 -1964 Realschule Fallingbostel; Abschluß mit dem Zeugnis der mittleren Reife.

1964 Fortsetzung der schulischen Ausbildung an der Nieders. Heimschule Helmstett, einem Gymnasium in Kurzform für Realschulabgänger.

1967 Abschluß mit dem Abiturszeugnis.

Berufliche Ausbildung:

WS 1967/8 Beginn des Studiums an der Universität Tübingen im Fach Biochemie.

Herbst 1970 Vordiplom-Prüfung.

WS 1970/1 Fortsetzung des Studiums an der Ruhr-Universität Bochum in der Abteilung Chemie.

Nov. 1973 Zeugnis über die Diplom-Hauptprüfung in Chemie.

Seit Jan. 1974 promoviere ich am Lehrstuhl für Biochemie der Ruhr-Universität Bochum bei Prof. Dr. G. Pfeleiderer.

